(19)日本国特許庁（ＪＰ）　(12) **公表特許公報**（Ａ）　(11)特許出願公表番号
特表2000－509608
（P2000－509608A）
(43)公表日　平成12年８月２日(2000.8.2)

(51)Int.Cl.[7]	識別記号	ＦＩ		ﾃｰﾏｺｰﾄﾞ(参考)
Ｃ１２Ｑ　1/68		Ｃ１２Ｑ　1/68	Ａ	
Ｃ１２Ｎ　15/09	ＺＮＡ	Ｃ１２Ｎ　15/00	ＺＮＡＡ	

審査請求　未請求　　予備審査請求　有　　（全290頁）

(21)出願番号　特願平10－500916
(86)（22)出願日　平成９年６月４日(1997.6.4)
(85)翻訳文提出日　平成10年12月４日(1998.12.4)
(86)国際出願番号　ＰＣＴ／ＵＳ９７／１００００８
(87)国際公開番号　ＷＯ９７／４６７１４
(87)国際公開日　平成９年12月11日(1997.12.11)
(31)優先権主張番号　０８／６５８，９９３
(32)優先日　平成８年６月４日(1996.6.4)
(33)優先権主張国　米国（ＵＳ）
(31)優先権主張番号　０８／８１８，２６７
(32)優先日　平成９年３月17日(1997.3.17)
(33)優先権主張国　米国（ＵＳ）

(71)出願人　ユニバーシティ　オブ　ユタ　リサーチ　ファウンデーション
アメリカ合衆国・ユタ州　84112・ソルト　レイク　シティ・パーク　ビルディング　210
(72)発明者　ウィットワー，カール，ティー．
アメリカ合衆国・ユタ州　84108・ソルト　レイク・イースト　1700　サウス　2568
(72)発明者　リリー，カーク，エム．
アメリカ合衆国・アイダホ州　84302・アイダホ　フォールズ・チェストナット　ストリート　149
(74)代理人　弁理士　一色　健輔　（外２名）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＰＣＲ中のハイブリダイゼーションのモニタリング

(57)【要約】
ポリメラーゼ・チェーン・リアクション中のハイブリダイゼーションをモニタする方法を開示する。本法は高速熱サイクルと二重鎖ＤＮＡ染料又は特異性ハイブリダイゼーション・プローブの使用で実現される。蛍光共鳴エネルギー転移対はフルオレセインとＣｙ５又はＣｙ５．５を含む。増幅ＤＮＡを定量し純度を判定するための方法は溶解及び徐冷復元曲線の分析により行なわれる。

【特許請求の範囲】

１．生物学的サンプルの標的ＤＮＡ配列を分析するための方法であって、

標的配列の隣接部分にハイブリダイゼーションする２種類の核酸プローブ存在下に標的配列をポリメラーゼ連鎖反応により増幅するステップであって、前記プローブの一方は蛍光エネルギー転移対の受容体蛍光物質で標識され、前記プローブの他方は供与体蛍光物質で標識されて、前記標的配列と前記２種類のプローブのハイブリダイゼーション時に前記供与体蛍光物質及び受容体蛍光物質が互いに２５ヌクレオチド以内にあるようにし、前記ポリメラーゼ連鎖反応には前記標的核酸配列に対する熱安定性ポリメラーゼとプライマーを前記生物学的サンプルに添加するステップと少なくとも変性温度と延長温度との間で前記生物学的サンプルを熱サイクルするステップとを含むステップと、

前記供与体蛍光物質によって吸収される波長の光で前記生物学的サンプルを励起して前記蛍光エネルギー転移対からの放射を検出するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

２．生物学的サンプルの標的ＤＮＡ配列を分析するための方法であって、

標的配列の隣接部分にハイブリダイゼーションする２種類の核酸プローブ存在下に標的配列をポリメラーゼ連鎖反応により増幅するステップであって、前記プローブの一方は蛍光エネルギー転移対の受容体蛍光物質で標識され、前記プローブの他方は供与体蛍光物質で標識されて、前記標的配列と前記２種類のプローブのハイブリダイゼーション時に前記供与体蛍光物質及び受容体蛍光物質が互いに２５ヌクレオチド以内にあるようにし、前記ポリメラーゼ連鎖反応には前記標的核酸配列に対する熱安定性ポリメラーゼとプライマーを前記生物学的サンプルに添加するステップと少なくとも変性温度と延長温度との間で前記生物学的サンプルを熱サイクルするステップとを含むステップと、

前記供与体蛍光物質によって吸収される波長の光で前記サンプルを励起するステップと、

前記蛍光エネルギー転移対からの温度依存性蛍光をモニタするステップと、

を含むことを特徴とする方法。

３．前記供与体蛍光物質と前記受容体蛍光物質が約０～５ヌクレオチドの距離にあることを特徴とする請求項１又は請求項２に記載の方法。

４．前記供与体蛍光物質と前記受容体蛍光物質が約０～２ヌクレオチドの距離にあることを特徴とする請求項３に記載の方法。

５．前記供与体蛍光物質と前記受容体蛍光物質が１ヌクレオチドの距離にあることを特徴とする請求項４に記載の方法。

６．生物学的サンプルにおける標的核酸配列のポリメラーゼ連鎖反応増幅をリアルタイムでモニタする方法であって、

（ａ）前記生物学的サンプルに２種類の核酸プライマーと核酸プローブの有効量を添加し、前記プライマーの一方と前記プローブは各々受容体蛍光物質と供与体蛍光物質を含む蛍光エネルギー転移対の１つの構成要素で標識され、前記標識されたプローブは前記標識されたプライマーの１５ヌクレオチド以内の前記標的核酸配列の増幅されたコピーにハイブリダイゼーションするステップと、

（ｂ）ポリメラーゼ連鎖反応により前記標的核酸配列を増幅するステップと、

（ｃ）前記供与体蛍光物質によって吸収される選択した波長の光で前記生物学的サンプルを照明するステップと、

（ｄ）前記サンプルの蛍光放射を検出するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

７．前記サンプルの温度依存性蛍光をモニタするステップをさらに含むことを特徴とする請求項６に記載の方法。

８．前記供与体蛍光物質と前記受容体蛍光物質は互いから約４～６ヌクレオチドの距離にあることを特徴とする請求項６に記載の方法。

９．生物学的サンプルの標的核酸配列を増幅する方法の改良であって、

（ａ）前記生物学的サンプルに核酸結合蛍光体の有効量を添加するステップと、

（ｂ）ポリメラーゼ連鎖反応を用い、初期の所定の温度と時間パラメータを用いて前記生物学的サンプルを熱サイクルし、次いで

（ｉ）前記ポリメラーゼ連鎖反応中に前記蛍光体によって吸収される光の選

択した波長で前記生物学的サンプルを照明するステップと、

（ｉｉ）前記サンプルからの蛍光をモニタして前記ポリメラーゼ連鎖反応に最適な温度及び時間パラメータを決定するステップと、

（ｉｉｉ）前記蛍光にしたがって前記初期温度及び時間パラメータを調節するステップと、

を含む前記標的核酸配列を増幅するステップと、

を含むことを特徴とする改良。

１０．前記蛍光体は二重鎖特異性核酸結合染料を含むことを特徴とする請求項９に記載の方法。

１１．前記蛍光体は前記標的核酸配列にハイブリダイゼーションする蛍光標識オリゴヌクレオチド・プローブを含むことを特徴とする請求項９に記載の方法。

１２．前記蛍光体はオリゴヌクレオチド・プローブの対を含み、前記プローブの一方は蛍光エネルギー転移対の受容体蛍光物質で標識され、前記プローブの他方は供与体蛍光物質で標識されることを特徴とする請求項９に記載の方法。

１３．前記供与体蛍光物質放射と前記受容体蛍光物質吸収のスペクトルが２５％未満でオーバラップし、前記受容体蛍光物質は１００，０００$M^{-1}cm^{-1}$以上のピーク吸光係数を有し前記２種類のプローブのハイブリダイゼーション時に前記供与体蛍光物質と受容体蛍光物質は互いから１５ヌクレオチド以内にあることを特徴とする請求項１２に記載の方法。

１４．前記共鳴エネルギー転移対は供与体としてフルオレセイン又受容体としてＣｙ５又はＣｙ５．５を含むことを特徴とする請求項１３に記載の方法。

１５．生物学的サンプルの標的核酸配列を検出するための方法であって、

（ａ）前記生物学的サンプルに前記標的核酸配列とハイブリダイゼーションするオリゴヌクレオチド・プローブ対の有効量を添加し、前記プローブの一方は蛍光エネルギー転移対の受容体蛍光物質で標識され、前記プローブの他方は供与体蛍光物質で標識され、前記供与体蛍光物質の放射スペクトルと前記受容体蛍光物質の吸収スペクトルが２５％未満でオーバラップし、前記受容体蛍光物質は１００，０００$M^{-1}cm^{-1}$以上のピーク吸光係数を有し前記２種類のプローブのハイ

ブリダイゼーション時に前記供与体蛍光物質と受容体蛍光物質が互いの２５ヌクレオチド以内にあるようにするステップと、

（ｂ）前記供与体蛍光物質によって吸収される光の選択した波長で前記生物学的サンプルを照明するステップと、

（ｃ）前記生物学的サンプルの放射を検出するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

１６．前記共鳴エネルギー転移対は供与体としてフルオレセインを含むことを特徴とする請求項１５に記載の方法。

１７．前記共鳴エネルギー転移対は受容体としてＣｙ５又はＣｙ５．５を含むことを特徴とする請求項１６に記載の方法。

１８．前記供与体蛍光物質と前記受容体蛍光物質は前記２種類のプローブの前記標的核酸配列とのハイブリダイゼーション時に互いに約０～５ヌクレオチド以内にあることを特徴とする請求項１５に記載の方法。

１９．前記供与体蛍光物質と前記受容体蛍光物質は互いの約０～２ヌクレオチド以内にあることを特徴とする請求項１８に記載の方法。

２０．前記供与体蛍光物質と前記受容体蛍光物質は互いの１ヌクレオチド以内にあることを特徴とする請求項１９に記載の方法。

２１．フルオレセインで標識した第１のプローブとＣｙ５又はＣｙ５．５で標識した第２のプローブを含むことを特徴とする蛍光エネルギー転移対。

２２．生物学的サンプルにおける標的核酸配列のポリメラーゼ連鎖反応増幅をリアルタイムでモニタする方法であって、

標的配列の隣接部分にハイブリダイゼーションする２種類の核酸プローブ存在下に標的配列をポリメラーゼ連鎖反応により増幅するステップであって、前記プローブの一方は蛍光エネルギー転移対の受容体蛍光物質で標識され、前記プローブの他方は供与体蛍光物質で標識されて、前記標的配列と前記２種類のプローブのハイブリダイゼーション時に前記供与体蛍光物質及び受容体蛍光物質が互いに２５ヌクレオチド以内にあるようにし、前記ポリメラーゼ連鎖反応には前記標的核酸配列に対する熱安定性ポリメラーゼとプライマーを前記生物学的サンプルに

添加するステップと少なくとも変性温度と延長温度との間で前記生物学的サンプルを熱サイクルするステップとを含むステップと、

前記供与体蛍光物質によって吸収される波長の光で前記生物学的サンプルを励起して前記生物学的サンプルからの放射を検出するステップと、

前記蛍光エネルギー転移対からの温度依存性蛍光をモニタするステップと、

を含むことを特徴とする方法。

２３．前記共鳴エネルギー転移対は供与体としてフルオレセイン又受容体としてＣｙ５又はＣｙ５．５を含むことを特徴とする請求項２２に記載の方法。

２４．前記供与体蛍光物質と前記受容体蛍光物質は互いの約０～５ヌクレオチド以内にあることを特徴とする請求項２２に記載の方法。

２５．前記供与体蛍光物質と前記受容体蛍光物質は互いの約０～２ヌクレオチド以内にあることを特徴とする請求項２４に記載の方法。

２６．前記供与体蛍光物質と前記受容体蛍光物質は互いの１ヌクレオチド以内にあることを特徴とする請求項２５に記載の方法。

２７．前記モニタするステップは前記標的配列から溶解する前記プローブの溶解プロファイルを決定するステップを含むことを特徴とする請求項２２に記載の方法。

２８．生物学的サンプルにおける標的核酸配列のポリメラーゼ連鎖反応増幅をリアルタイムでモニタする方法であって、

ＳＹＢＲ™グリーンＩ存在下にポリメラーゼ連鎖反応により前記標的配列を増幅し、前記ポリメラーゼ連鎖反応には前記標的核酸配列に対する熱安定性ポリメラーゼとプライマーを前記生物学的サンプルに添加するステップと少なくとも変性温度と延長温度の間で前記生物学的サンプルを熱サイクルするステップとを含むステップと、

ＳＹＢＲ™グリーンＩにより吸収される波長の光で前記生物学的サンプルを励起して前記生物学的サンプルからの放射を検出するステップと、

前記ＳＹＢＲ™グリーンＩからの温度依存性蛍光をモニタするステップと、

を含むことを特徴とする方法。

２９．前記モニタするステップは前記増幅した標的配列の溶解プロファイルを決定するステップを含むことを特徴とする請求項２８に記載の方法。

３０．生物学的サンプルの標的ＤＮＡ配列を分析するための方法であって、

（ａ）２種類の核酸プライマーと核酸プローブの有効量を前記生物学的サンプルに添加し、前記プライマーの一方と前記プローブは互いに受容体蛍光物質と供与体蛍光物質を含む蛍光エネルギー転移対の一方の構成要素で標識され、前記標識されたプローブが前記標識されたプライマーの１５ヌクレオチド以内の前記標的核酸配列の増幅コピーとハイブリダイゼーションするステップと、

（ｂ）ポリメラーゼ連鎖反応により前記標的核酸配列を増幅するステップと、

（ｃ）前記供与体蛍光物質によって吸収される選択した波長の光で前記生物学的サンプルを照明して前記サンプルの蛍光放射を検出するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

３１．前記サンプルの温度依存性蛍光をモニタするステップをさらに含むことを特徴とする請求項３０に記載の方法。

３２．前記モニタするステップは前記増幅した標的配列の溶解プロファイルを決定するステップを含むことを特徴とする請求項３１に記載の方法。

３３．前記共鳴エネルギー転移対は供与体としてフルオレセインを又受容体としてＣｙ５又はＣｙ５．５を含むことを特徴とする請求項３０に記載の方法。

３４．前記供与体蛍光物質と前記受容体蛍光物質は互いから約４～６ヌクレオチド以内にあることを特徴とする請求項３０に記載の方法。

３５．第２の核酸と比較して第１の核酸における選択した配座での相違を検出する方法であって、

（ａ）ポリメラーゼ連鎖反応により前記第１の核酸の選択したセグメントと前記第２の核酸のこれに対応するセグメントとを増幅するように構成したオリゴヌクレオチド・プローブの対を提供し、前記選択したセグメントとこれに対応するセグメントは各々が前記選択した配座を含み、前記選択した配座のコピーを含む増幅生成物を得るステップと、

（ｂ）オリゴヌクレオチド・プローブの対を提供し、

前記プローブの一方は蛍光エネルギー転移対の受容体蛍光物質で、また前記プローブの他方は供与体蛍光物質で標識して、前記供与体蛍光物質と受容体蛍光物質が前記２種類のプローブと前記増幅生成物とのハイブリダイゼーション時に共鳴エネルギー転移関係になるようにし、前記プローブの一方は前記増幅生成物にハイブリダイゼーションするように構成して前記一方のプローブが前記選択した配座にまたがり前記第１の核酸において前記第２の核酸の溶解プロファイルから識別可能な相違が存在する場合に溶解プロファイルを示すようにするステップと、

（ｃ）前記第１の核酸の選択したセグメントと前記第２の核酸の対応するセグメントとを有効量のプローブの存在下においてポリメラーゼ連鎖反応により増幅して増幅された選択セグメントと増幅された対応セグメントとを得て、少なくともこれらの一部分が共鳴エネルギー転移関係にある蛍光共鳴エネルギー転移対によりこれらにハイブリダイゼーションされた両方のプローブを有するようにするステップと、

（ｄ）前記プローブをハイブリダイゼーションした前記増幅した選択セグメント及び前記増幅した対応セグメントを、蛍光共鳴エネルギー転移対によって蛍光が顕在化するように選択した波長の光で照明するステップと、

（ｅ）温度の関数として蛍光放射を測定し前記第１の核酸の増幅された選択セグメントから溶解する前記プローブの一方の第１の溶解プロファイルと前記第２の核酸の増幅された対応セグメントから溶解する前記プローブの一方の第２の溶解プロファイルを決定するステップと、

（ｆ）前記第１の溶解プロファイルを前記第２の溶解プロファイルと比較し、これらの相違が前記サンプル核酸における相違の存在を示すようにするステップと、

を含むことを特徴とする方法。

３６．前記共鳴エネルギー転移対が供与体としてフルオレセインを又受容体としてＣｙ５及びＣｙ５．５から構成されるグループから選択した構成要素を含むことを特徴とする請求項３５に記載の方法。

３７．前記供与体と前記受容体がプローブに結合され、両方のプローブが前記増

幅した選択セグメント又は前記増幅した対応セグメントにハイブリダイゼーションした場合前記供与体と前記受容体が約２５ヌクレオチド残基以上離れないようにすることを特徴とする請求項３５に記載の方法。

３８．前記供与体と前記受容体がプローブに結合され、前記プローブが前記増幅した選択セグメント又は前記増幅した対応セグメントにハイブリダイゼーションした場合前記供与体と前記受容体が約０～５ヌクレオチド残基だけ離れるようにすることを特徴とする請求項３７に記載の方法。

３９．前記共鳴エネルギー転移供与体と前記共鳴エネルギー転移受容体が前記プローブに結合され、前記プローブが前記増幅した選択セグメント又は前記増幅した対応セグメントにハイブリダイゼーションした場合前記供与体と前記受容体が約０～２ヌクレオチド残基だけ離れるようにすることを特徴とする請求項３８に記載の方法。

４０．前記共鳴エネルギー転移供与体と前記共鳴エネルギー転移受容体が前記プローブに結合され、前記プローブが前記増幅した選択セグメント又は前記増幅した対応セグメントにハイブリダイゼーションした場合前記受容体と前記供与体が１ヌクレオチド残基だけ離れるようにすることを特徴とする請求項３９に記載の方法。

４１．第２の核酸と比較して第１の核酸における選択した配座での相違を検出する方法であって、

（ａ）ポリメラーゼ連鎖反応により前記第１の核酸の選択したセグメントと前記第２の核酸の対応するセグメントとを増幅するように構成したオリゴヌクレオチド・プローブの対を提供し、前記選択したセグメントとこれに対応するセグメントは各々が前記選択した配座を含み、前記選択した配座のコピーを含む増幅生成物を得るステップと、

（ｂ）オリゴヌクレオチド・プローブを提供し、前記プライマーの一方と前記プローブが各々供与体蛍光物質と受容体蛍光物質を含む蛍光エネルギー転移対の一方の構成要素で標識され、前記標識したプローブと標識したプライマーを前記増幅生成物にハイブリダイゼーションして前記供与体と前記受容体が共鳴エネル

ギー転移関係にあるようにし、前記プローブは前記増幅生成物とハイブリダイゼーションするように構成して前記プローブが前記選択した配座にまたがり前記第１の核酸において前記第２の核酸の溶解プロファイルから識別可能な相違が存在する場合溶解プロファイルを示すようにするステップと、

（ｃ）有効量のプライマーとプローブの存在かにおいてポリメラーゼ連鎖反応により前記第１の核酸の選択セグメントと前記第２の核酸のこれに対応するセグメントとを増幅して増幅された選択セグメントと増幅された対応セグメントとを得て、少なくともこれらの一部が共鳴エネルギー転移関係にある蛍光共鳴エネルギー転移対によりこれらにハイブリダイゼーションされた前記標識プライマー及びプローブを両方とも有するようにするステップと、

（ｄ）前記標識プライマー及びプローブがハイブリダイゼーションしている前記増幅した選択セグメントと前記増幅した対応セグメントを選択した波長の光で照明して蛍光共鳴エネルギー転移対による蛍光を顕在化するステップと、

（ｅ）温度の関数として蛍光放射を測定して第１の核酸の前記増幅選択セグメントから前記一方のプローブ溶解の第１の溶解プロファイルと第２の核酸の前記増幅対応セグメトから前記一方のプローブ溶解の第２の溶解プロファイルにおいて決定するステップと、

（ｆ）前記第１の溶解プロファイルを前記第２の溶解プロファイルと比較し、ここでの相違が前記サンプル核酸における相違の存在を示すようにするステップと、

を含むことを特徴とする方法。

４２．前記共鳴エネルギー転移対は供与体としてフルオレセインを又受容体としてＣｙ５及びＣｙ５．５から構成されるグループから選択した構成要素を含むことを特徴とする請求項４１に記載の方法。

４３．前記供与体と前記受容体が前記標識したプライマー及びプローブに結合され、前記標識したプローブ及びプライマーが前記増幅した選択セグメント又は前記増幅した対応セグメントにハイブリダイゼーションする場合に前記供与体と前記受容体が約１５ヌクレオチド残基以上離れないようにすることを特徴とする請

求項４１に記載の方法。

４４．前記供与体と前記受容体が前記標識したプライマー及びプローブに結合され、前記標識したプローブ及びプライマーが前記増幅した選択セグメント又は前記増幅した対応セグメントにハイブリダイゼーションする場合に前記供与体と前記受容体が約４～６ヌクレオチド残基だけ離れるようにすることを特徴とする請求項４３に記載の方法。

４５．個人のゲノムの選択された配位でのヘテロ接合を検出する方法であって、前記ゲノムは突然変異性対立遺伝子とこれに対応する基準対立遺伝子とを含み、その各々が選択された配位を含み、

（ａ）前記個人からサンプルとなるゲノムＤＮＡを採得するステップと、

（ｂ）ポリメラーゼ連鎖反応により前記突然変異対立遺伝子の第１の選択したセグメントと前記これに対応する基準対立遺伝子の第２の選択したセグメントを増幅するように構成されたオリゴヌクレオチド・プライマーの対を提供し、前記第１と第２の選択されたセグメントとの両方ともが前記選択された配位を含むステップと、

（ｃ）オリゴヌクレオチド・プローブの対を提供し、前記プローブの一方は受容体蛍光物質で標識し前記プローブの他方は蛍光共鳴エネルギー転移対の供与体蛍光物質で標識して前記増幅した第１と第２の選択セグメントと前記２種類のプローブのハイブリダイゼーション時に前記プローブの一方は前記選択された配位にまたがり前記増幅された第２の選択セグメントによる第２の溶解プロファイルから識別可能な前記増幅された第１の選択セグメントによる第１の溶解プロファイルを示すようにするステップと、

（ｄ）ポリメラーゼ連鎖反応により有効量のプローブの存在下でサンプル・ゲノムＤＮＡの前記第１と第２の選択ヤグメントを増幅して増幅された第１と第２の選択セグメントを得るようにし、少なくともその一部分が共鳴エネルギー転移関係にある蛍光共鳴エネルギー転移対によりこれらにハイブリダイゼーションされたプローブを両方とも有するようにするステップと、

（ｅ）前記標識したプライマーとプローブがハイブリダイゼーションされてい

る前記増幅した第１と第２の選択セグメントを選択した波長の光で照明して前記供与体及び受容体による蛍光を顕在化するステップと、

（ｆ）温度の関数として蛍光放射を測定して、前記増幅した第１の選択セグメントから溶解する前記一方のプローブの第１の溶解プロファイルと前記増幅した第２の選択セグメントから溶解する前記一方のプローブの第２の溶解プロファイルとを決定するステップと、

（ｇ）前記第１の溶解プロファイルと前記第２の溶解プロファイルとを比較し、識別可能な溶解プロファイルが前記サンプル・ゲノムＤＮＡのヘテロ接合性を表わすようにするステップと、

を含むことを特徴とする方法。

４６．前記蛍光共鳴エネルギー転移対が、供与体としてフルオレセインを又受容体としてＣｙ５又はＣｙ５．５を含むことを特徴とする請求項４５に記載の方法。

４７．前記供与体と前記受容体が前記プローブに結合され前記プローブと基準オリゴヌクレオチドが前記増幅された第１の選択セグメント又は前記増幅された第２の選択セグメントにハイブリダイゼーションされる場合前記供与体と前記受容体が２５ヌクレオチド残基以上に離れないようにすることを特徴とする請求項４５に記載の方法。

４８．前記供与体と前記受容体が前記プローブに結合され前記プローブが前記増幅された第１の選択セグメント又は前記増幅された第２の選択セグメントにハイブリダイゼーションされる場合前記供与体と前記受容体が約０～５ヌクレオチド残基だけ離れるようにすることを特徴とする請求項４７に記載の方法。

４９．前記供与体と前記受容体が前記プローブに結合され前記プローブが前記増幅された第１の選択セグメント又は前記増幅された第２の選択セグメントにハイブリダイゼーションされる場合前記供与体と前記受容体が約０～２ヌクレオチド残基だけ離れるようにすることを特徴とする請求項４８に記載の方法。

５０．前記供与体と前記受容体が前記プローブに結合され前記プローブが前記増幅された第１の選択セグメント又は前記増幅された第２の選択セグメントにハイブリダイゼーションされる場合前記供与体と前記受容体が１ヌクレオチド残基だ

け離れるようにすることを特徴とする請求項４９に記載の方法。

５１．個人のゲノムにおいて選択された配座でのヘテロ接合性を検出する方法であって、前記ゲノムは突然変異性対立遺伝子とこれに対応する基準対立遺伝子とを含み、その各々が選択された配座を含み、

（ａ）前記個人からサンプルとなるゲノムＤＮＡを採得するステップと、

（ｂ）ポリメラーゼ連鎖反応により前記突然変異対立遺伝子の第１の選択したセグメントと前記これに対応する基準対立遺伝子の第２の選択したセグメントを増幅するように構成されたオリゴヌクレオチド・プライマーの対を提供し、前記第１と第２の選択されたセグメントとの両方ともが前記選択された配座を含むステップと、

（ｃ）オリゴヌクレオチド・プローブの対を提供し、前記プライマーの一方と前記プローブが各々供与体蛍光物質と受容体蛍光物質とを含む蛍光エネルギー転移対の一方の構成要素で標識され、前記標識されたプローブと標識されたプライマーが前記増幅された第１と第２の選択セグメントにハイブリダイゼーションして前記プローブの一方が前記選択した配座にまたがり前記増幅された第２の選択セグメントによる第２の溶解プロファイルから識別可能な前記増幅された第１の選択セグメントによる第１の溶解プロファイルを示すようにするステップと、

（ｄ）ポリメラーゼ連鎖反応により有効量のプローブ及びプライマーの存在下でサンプル・ゲノムＤＮＡの前記第１と第２の選択セグメントを増幅して増幅された第１と第２の選択セグメントを得るようにし、少なくともその一部分が両方とも共鳴エネルギー転移関係にある蛍光共鳴エネルギー転移対によりこれらにハイブリダイゼーションされたプローブを有するステップと、

（ｅ）選択した波長の光によりハイブリダイゼーションされたプローブを有する前記増幅された第１と第２の選択セグメントを照明して、前記供与体と受容体による蛍光を顕在化するステップと、

（ｆ）温度の関数として蛍光放射を測定して、前記増幅した第１の選択セグメントから溶解する前記一方のプローブの第１の溶解プロファイルと前記増幅した第２の選択セグメントから溶解する前記一方のプローブの第２の溶解プロファイ

ルとを決定するステップと、

（ｇ）前記第１の溶解プロファイルと前記第２の溶解プロファイルとを比較して、識別可能な溶解プロファイルが前記サンプル・ゲノムＤＮＡのヘテロ接合性を表わすようにするステップと、

を含むことを特徴とする方法。

５２．前記共鳴エネルギー転移対は供与体としてフルオレセインを又受容体としてＣｙ５又はＣｙ５．５を含むことを特徴とする請求項５１に記載の方法。

５３．前記供与体と前記受容体が前記標識プライマー及びプローブに結合され、前記標識プライマー及びプローブが前記増幅された第１の選択セグメント又は前記増幅された第２の選択セグメントにハイブリダイゼーションする場合前記供与体と前記受容体が約１５ヌクレオチド残基以上離れないようにすることを特徴とする請求項５１に記載の方法。

５４．前記供与体と前記受容体が前記標識プライマー及びプローブに結合され、前記標識プライマーとプローブが前記増幅された第１の選択セグメント又は前記増幅された第２の選択セグメントにハイブリダイゼーションされる場合前記供与体と前記受容体が４～６ヌクレオチド残基だけ離れるようにすることを特徴とする請求項５３に記載の方法。

５５．（１）核酸、ただし前記核酸又はそのポリメラーゼ連鎖反応増幅した生成物が２種類の異なった相補鎖から構成され、（２）前記核酸の選択したセグメントをポリメラーゼ連鎖反応によって増幅して増幅生成物を得るように構成された２種類のオリゴヌクレオチド・プローブ、（３）前記ポリメラーゼ連鎖反応を触媒するためのＤＮＡポリメラーゼを含むポリメラーゼ連鎖反応混合物においてポリメラーゼ連鎖反応の完了を決定する方法であって、

（ａ）前記混合物に（１）蛍光共鳴エネルギー転移対の共鳴エネルギー転移供与体又は共鳴エネルギー転移受容体で標識され、選択された温度条件と単価イオン強度で前記増幅生成物にハイブリダイゼーションするように構成された有効量のオリゴヌクレオチド・プライマーと、（２）前記供与体又は前記受容体で標識され、前記プローブと基準オリゴヌクレオチドの間で一方が前記供与体で標識さ

れ他方が前記受容体で標識され、前記基準オリゴヌクレオチドは前記選択された温度及び単価イオン強度の条件下で前記増幅生成物にハイブリダイゼーションするように構成されて前記プローブと前記基準オリゴヌクレオチドが両方とも前記増幅生成物にハイブリダイゼーションする場合前記供与体及び前記受容体が共鳴エネルギー転移関係にあるようにする有効量の基準オリゴヌクレオチドとを添加するステップと、

（ｂ）前記核酸の選択セグメントをポリメラーゼ連鎖反応によって増幅して前記増幅生成物を得るようにし、少なくともその一部分は共鳴エネルギー転移関係にある蛍光共鳴エネルギー転移対によりこれらにハイブリダイゼーションされた前記プローブと前記基準オリゴヌクレオチドの両方を有するようにするステップと、

（ｃ）選択した波長の光でハイブリダイゼーションされたプローブと基準オリゴヌクレオチドとを有する前記増幅生成物を照明して前記蛍光共鳴エネルギー対による蛍光を顕在化させ、蛍光放射をモニタして、前記蛍光放射が前記反応の完了を表わすプラトー・フェーズに達した時点でサイクルを決定するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

５６．前記蛍光共鳴エネルギー転移対はフルオレセインと、Ｃｙ５及びＣｙ５．５から構成されるグループから選択した構成要素であることを特徴とする請求項５５に記載の方法。

５７．（１）核酸、ただし前記核酸又はそのポリメラーゼ連鎖反応増幅した生成物が２種類の異なった相補鎖から構成され、（２）前記核酸の選択したセグメントをポリメラーゼ連鎖反応によって増幅して増幅生成物を得るように構成された２種類のオリゴヌクレオチド・プライマー、（３）前記ポリメラーゼ連鎖反応を触媒するためのＤＮＡポリメラーゼを含むポリメラーゼ連鎖反応混合物におけるポリメラーゼ連鎖反応の完了を決定する方法は、

（ａ）前記混合物に有効量の核酸結合蛍光染料を添加するステップと、

（ｂ）前記核酸結合蛍光染料が添加された前記混合物でポリメラーゼ連鎖反応により前記選択した核酸セグメントを増幅して核酸結合蛍光染料が結合した前記

増幅生成物を得るステップと、

（ｃ）核酸結合蛍光染料が結合している増幅生成物に選択した波長の光を照明してここからの蛍光を顕在化し、蛍光放射をモニタして、前記蛍光放射が前記反応の完了を表わすプラトー・フェーズに達した時点でサイクルを決定するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

５８．前記核酸結合蛍光染料はＳＹＢＲ™グリーンＩ、臭化エチジウム、ピコグリーン、アクリジン・オレンジ、チアゾール・オレンジ、ＹＯ－ＰＲＯ－１、クロモマイシンＡ３から構成されるグループから選択される構成要素とすることを特徴とする請求項５７に記載の方法。

５９．前記核酸結合蛍光染料はＳＹＢＲ™グリーンＩであることを特徴とする請求項５８に記載の方法。

６０･二重鎖特異性蛍光染料を含むポリメラーゼ連鎖反応混合物のアニーリング、延長、変性フェーズの反復サイクルを含むポリメラーゼ連鎖反応の温度サイクル・パラメータを制御する方法であって、前記パラメータは前記アニーリング・フェーズの持続時間と、前記変性フェーズの持続時間と、サイクル数とを含み、

（ａ）選択した波長の光で前記反応を照明して前記蛍光染料からの蛍光を顕在化させ前記反復アニーリング、拡張、変性フェーズの間に蛍光を連続モニタするステップと、

（ｂ）少なくとも、

（ｉ）前記拡張フェーズの間に蛍光が増加を停止する持続時間、又は

（ｉｉ）前記変性フェーズの間に前記蛍光が基線レベルまで減少する持続時間、又は

（ｉｉｉ）前記拡張フェーズの間に前記蛍光が所定のレベルに達した回数

を決定するステップと、

（ｃ）前記拡張フェーズの間に蛍光が増加を停止する時間の長さに基づいた前記拡張フェーズの長さ、前記変性フェーズの間に蛍光が前記基線レベルまで減少した時間の長さに基づいた前記変性フェーズの長さ、又は前記拡張フェーズの間

に蛍光が前記所定レベルに達したサイクル数に基づくサイクル数を調節するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

６１．前記核酸結合蛍光染料はＳＹＢＲ™グリーンＩ、臭化エチジウム、ピコグリーン、アクリジン・オレンジ、チアゾール・オレンジ、ＹＯ－ＰＲＯ－１、クロモマイシンＡ３から構成されるグループから選択される構成要素とすることを特徴とする請求項６０に記載の方法。

６２．前記核酸結合蛍光染料はＳＹＢＲ™グリーンＩであることを特徴とする請求項６１に記載の方法。

６３．選択したポリメラーゼ連鎖反応混合物における増幅生成物の濃度を決定する方法であって、

（ａ）前記増幅生成物の既知の濃度のハイブリダイゼーションのレートをモニタすることにより選択した温度と反応条件での前記増幅生成物での２次速度定数を決定するステップと、

（ｂ）前記増幅生成物の未知の濃度でのアニーリング速度を決定するステップと、

（ｃ）前記アニーリング速度と前記２次速度定数から前記増幅生成物の濃度を計算するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

６４．前記アニーリング速度は多数サイクルの増幅後に決定されることを特徴とする請求項６３に記載の方法。

６５．前記二次速度定数を決定するステップは、

既知の濃度の前記増幅生成物と有効量の二重鎖特異性蛍光染料とを含む第１のポリメラーゼ連鎖反応混合物の温度を、前記増幅生成物の変性温度以上に上昇して変性増幅生成物を得るステップと、

前記既知の量の変性増幅生成物を含む前記第１のポリメラーゼ連鎖反応混合物の温度を、前記増幅生成物の変性温度以下の選択した温度まで急冷すると同時に時間の関数として前記第１のポリメラーゼ連鎖反応混合物の蛍光を連続モニタす

るステップと、

極大蛍光、極小蛍光、極小蛍光の時間、及び増幅生成物の既知の濃度での２次速度定数を決定するため、式：

$$F = F_{max} - \frac{F_{max} - F_{min}}{k\ (t - t_0)\ [DNA] + 1}$$

ただしＦは蛍光、F_{max}は極大蛍光、F_{min}は極小蛍光、ｋは２次速度定数、t_0はF_{min}での時間、［ＤＮＡ］は前記増幅生成物の既知の濃度とする

から時間の関数として蛍光をプロットするステップと、

を含むことを特徴とする請求項６３に記載の方法。

６６．前記核酸結合蛍光染料はＳＹＢＲ™グリーンＩ、臭化エチジウム、ピコグリーン、アクリジン・オレンジ、チアゾール・オレンジ、ＹＯ－ＰＲＯ－１、クロモマイシンＡ３から構成されるグループから選択される構成要素とすることを特徴とする請求項６５に記載の方法。

６７．前記核酸結合蛍光染料はＳＹＢＲ™グリーンＩであることを特徴とする請求項６６に記載の方法。

６８．　競合的定量ポリメラーゼ連鎖反応による選択した核酸テンプレートの濃度を決定する方法であって、

（ａ）（ｉ）ポリメラーゼ連鎖反応において前記選択したテンプレートの選択したセグメントと相補的テンプレートのこれに対応する選択したセグメントを増幅してこれらの増幅生成物を得るように構成したオリゴヌクレオチド・プライマーの対の各々の有効量と、

（ｉｉ）蛍光共鳴エネルギー転移対の共鳴エネルギー転移供与体又は共鳴エネルギー転移受容体で標識された有効量のオリゴヌクレオチド・プローブであって、前記プローブが前記競合的テンプレートの増幅生成物から溶解する溶解温度から識別可能な溶解温度での前記選択したテンプレートの増幅生成物から溶解するように前記増幅生成物にハイブリダイゼーションするように構成されている前記プローブと、

（ｉｉｉ）前記プローブと転移オリゴヌクレオチドの間で一方が前記供与体

により標識され他方が前記受容体により標識されているとして、前記供与体又は前記受容体で標識された有効量の基準オリゴヌクレオチドであって、前記基準オリゴヌクレオチドは前記プローブと前記基準オリゴヌクレオチドの両方が前記増幅生成物にハイブリダイゼーションする場合に前記供与体と前記受容体が共鳴エネルギー転移関係になるように前記増幅生成物にハイブリダイゼーションするよう構成されたオリゴヌクレオチドと、

を含む反応混合物において、

ポリメラーゼ連鎖反応により、未知の量の選択したテンプレートと既知の量の前記競合的テンプレートを増幅して前記増幅生成物を得るステップと、

（ｂ）前記反応混合物を選択した波長の光で照明して蛍光共鳴エネルギー転移対による蛍光を顕在化させ、反応混合物の温度が変化して前記選択したテンプレートの前記増幅生成物から溶解する前記プローブの第１の溶解曲線と前記競合的テンプレートから溶解する前記プローブの第２の溶解曲線とを得る場合に温度の関数として蛍光放射を決定するステップと、

（ｃ）前記第１と第２の溶解曲線から第１と第２の溶解溶解ピークに変換して当該溶解ピークから前記選択したテンプレートと前記競合的テンプレートの相対量を決定するステップと、

（ｄ）前記既知の量の前記競合的テンプレートと、前記選択したテンプレート及び競合的テンプレートの相対量とに基づいて前記選択したテンプレートの濃度を計算するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

６９．前記基準オリゴヌクレオチドはオリゴヌクレオチド・プライマーの対の一方であることを特徴とする請求項６８に記載の方法。

７０．前記共鳴エネルギー転移対は供与体としてフルオレセイン又受容体としてＣｙ５又はＣｙ５．５を含むことを特徴とする請求項６９に記載の方法。

７１．前記供与体と前記受容体は前記プローブ及び基準オリゴヌクレオチドに結合され、前記プローブと基準ヌクレオチドが前記増幅ヤグメントにハイブリダイゼーションした場合に前記供与体と前記受容体が約２５ヌクレオチド残基以上離

れないようにすることを特徴とする請求項６９に記載の方法。

７２．前記供与体と前記受容体は前記プローブ及び基準オリゴヌクレオチドに結合され、前記プローブと基準ヌクレオチドが前記増幅セグメントにハイブリダイゼーションした場合に前記供与体と前記受容体が約０～５ヌクレオチド残基だけ離れるようにすることを特徴とする請求項７１に記載の方法。

７３．前記供与体と前記受容体は前記プローブ及び基準オリゴヌクレオチドに結合され、前記プローブとトランスファヌクレオチドが前記増幅セグメントにハイブリダイゼーションした場合に前記供与体と前記受容体が約０～２ヌクレオチド残基だけ離れるようにすることを特徴とする請求項７２に記載の方法。

７４．前記供与体と前記受容体は前記プローブ及び基準オリゴヌクレオチドに結合され、前記プローブとトランスファヌクレオチドが前記増幅セグメントにハイブリダイゼーションした場合に前記供与体と前記受容体が１ヌクレオチド残基だけ離れるようにすることを特徴とする請求項７３に記載の方法。

７５．前記基準ヌクレオチドが前記オリゴヌクレオチド・プライマーの一方ではないことを特徴とする請求項６８に記載の方法。

７６．前記共鳴エネルギー転移対は供与体としてフルオレセイン又受容体としてＣｙ５又はＣｙ５．５を含むことを特徴とする請求項７５に記載の方法。

７７．前記供与体と前記受容体は前記プローブ及び基準オリゴヌクレオチドに結合され、前記プローブと基準ヌクレオチドが前記増幅セグメントにハイブリダイゼーションした場合に前記供与体と前記受容体が約１５ヌクレオチド残基以上離れないようにすることを特徴とする請求項７６に記載の方法。

７８．前記供与体と前記受容体は前記プローブ及び基準オリゴヌクレオチドに結合され、前記プローブと基準ヌクレオチドが前記増幅セグメントにハイブリダイゼーションした場合に前記供与体と前記受容体が約４～６ヌクレオチド残基だけ離れるようにすることを特徴とする請求項７７に記載の方法。

７９．フルオレセインとＣｙ５からなることを特徴とする蛍光共鳴エネルギー転移対。

８０．フルオレセインとＣｙ５．５からなることを特徴とする蛍光共鳴エネルギ

ー転移対。

８１．　ポリメラーゼ連鎖反応において選択した核酸テンプレートの濃度を決定する方法であって、

（ａ）（ｉ）ポリメラーゼ連鎖反応において前記選択したテンプレートの選択した第１のセグメントを増幅して増幅した第１の生成物を得るように構成された第１の対のオリゴヌクレオチド・プライマーの各々の有効量と、

（ｉｉ）ポリメラーゼ連鎖反応において基準テンプレートの選択した第２のセグメントを増幅して増幅した第２の生成物を得るように構成された第２の対のオリゴヌクレオチド・プライマーの各々の有効量と、

（ｉｉｉ）核酸結合蛍光染料の有効量と、

を含む反応混合物において、

ポリメラーゼ連鎖反応により、未知の量の前記選択したテンプレートを増幅して前記増幅した第１の生成物を得る及び既知の量の前記基準テンプレートを増幅して前記増幅した第２の生成物を得るステップと、

（ｂ）選択した波長の光で前記反応混合物を照明して核酸結合蛍光染料による蛍光を顕在化させ、温度の関数として放射された蛍光を連続的にモニタして第１の生成物と第２の生成物が異なる温度で溶解するような前記増幅生成物の溶解曲線を得るステップと、

（ｃ）前記溶解曲線を溶解溶解ピークに変換して当該溶解ピークから前記選択したテンプレートと前記基準テンプレートの相対量を決定するステップと、

（ｄ）前記既知の量の前記基準テンプレートと選択したテンプレート及び基準テンプレートの相対量とに基づいて前記選択したテンプレートの濃度を計算するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

８２．前記核酸結合蛍光染料はＳＹＢＲ™グリーンＩ、臭化エチジウム、ピコグリーン、アクリジン・オレンジ、チアゾール・オレンジ、ＹＯ－ＰＲＯ－１、クロモマイシンＡ３から構成されるグループから選択されることを特徴とする請求

項８１に記載の方法。

８３．前記核酸結合蛍光染料はＳＹＢＲ™グリーンＩであることを特徴とする請求項８２に記載の方法。

８４．陽性対照テンプレートも含むポリメラーゼ連鎖反応において選択したテンプレートの増幅をモニタする方法であって、

（ａ）（ｉ）ポリメラーゼ連鎖反応において前記選択したテンプレートの選択した第１のセグメントを増幅して増幅された第１の生成物を得るように構成された第１の対のオリゴヌクレオチド・プライマーの各々の有効量と、

（ｉｉ）ポリメラーゼ連鎖反応において、陽性対照テンプレートの選択された第２のセグメントを増幅して増幅された第２の生成物を得るように構成された第２の対のオリゴヌクレオチド・プライマーの各々の有効量と、

（ｉｉｉ）有効量の核酸結合蛍光染料と、

を含む反応混合物において、

前記選択したテンプレートと前記陽性対照テンプレートをポリメラーゼ連鎖反応によって増幅するための条件に前記選択したテンプレートと前記陽性対照テンプレートをさらすステップと、

（ｂ）前記反応混合物を選択した波長の光で照明して核酸結合蛍光染料による蛍光を顕在化し、前記ポリメラーゼ連鎖反応の増幅サイクル中に温度の関数として放射される蛍光を連続的にモニタして前記選択したテンプレートが増幅される場合前記増幅された第１の生成物の第１の溶解ピークを、また前記陽性対照テンプレートが増幅される場合前記増幅された第２の生成物の第２の溶解ピークを取得するステップとを含み、

前記第２の溶解曲線の取得はポリメラーゼ連鎖反応が作用したことを表わし、前記第１の溶解曲線の取得は前記選択した第１のセグメントが増幅可能であることを表わし、前記第１の溶解曲線が欠如していることは前記選択した第１のセグメントが増幅不可能であることを表わす

ことを特徴とする方法。

８５．前記核酸結合蛍光染料はＳＹＢＲ™グリーンＩ、臭化エチジウム、ピコグリーン、アクリジン・オレンジ、チアゾール・オレンジ、ＹＯ－ＰＲＯ－１、ク

ロモマイシンＡ３から構成されるグループから選択されることを特徴とする請求項８４に記載の方法。

８６．前記核酸結合蛍光染料がＳＹＢＲ™グリーンＩであることを特徴とする請求項８５に記載の方法。

８７．　個人の第Ｖ因子ライデン変異を検出する方法であって、第Ｖ因子ライデン変異は野生型と比較して第Ｖ因子ライデン変異配座での単一塩基変化で構成され、

（ａ）前記個人からサンプル・ゲノムＤＮＡを採得するステップと、

（ｂ）対照として野生型ゲノムＤＮＡを提供するステップと、

（ｃ）前記サンプル・ゲノムＤＮＡと前記野生型ゲノムＤＮＡの選択したセグメントをポリメラーゼ連鎖反応によって増幅するように構成されたオリゴヌクレオチド・プライマーの対を提供し、前記選択したセグメントは第Ｖ因子ライデン変異配座を含み、第Ｖ因子ライデン変異配座のコピーを含む増幅生成物を得るステップと、

（ｄ）蛍光共鳴エネルギー転移対の共鳴エネルギー転移供与体又は共鳴エネルギー転移受容体で標識されたオリゴヌクレオチド・プローブを提供し、前記プローブは前記増幅された生成物にハイブリダイゼーションするように構成されて前記プローブが前記変異配座にまたがり前記サンプル・ゲノムＤＮＡに前記野生型ゲノムＤＮＡの溶解プロファイルから区別できる第Ｖ因子ライデン変異が存在する場合溶解プロファイルを示すステップと、

（ｅ）共鳴エネルギー転移供与体又は共鳴エネルギー転移受容体で標識された転移オリゴヌクレオチドを提供し、前記プローブと転移オリゴヌクレオチドの間で一方が共鳴エネルギー転移供与体で標識され他方が共鳴エネルギー転移受容体で標識されているとして、前記転移オリゴヌクレオチドは前記増幅生成物にハイブリダイゼーションするように構成して前記プローブと前記転移オリゴヌクレオチドの両方が前記増幅生成物にハイブリダイゼーションする場合に共鳴エネルギー転移供与体と共鳴エネルギー転移受容体が共鳴エネルギー転移関係にあるようにするステップと、

（ｆ）有効量のオリゴヌクレオチド・プローブと転移オリゴヌクレオチドの存在下でサンプル・ゲノムＤＮＡと野生型ゲノムＤＮＡの前記選択したセグメントをポリメラーゼ連鎖反応により増幅して、増幅された選択セグメントを得るようにし、少なくともその一部分は共鳴エネルギー転移関係にある蛍光共鳴エネルギー転移対によりこれらにハイブリダイゼーションされた前記プローブと前記転移オリゴヌクレオチドの両方を有するようにするステップと、

（ｇ）前記ポリメラーゼ連鎖反応の増幅サイクルの間の温度の関数として蛍光を測定してサンプル・ゲノムＤＮＡの前記増幅セグメントから溶解する前記プローブの溶解プロファイルと前記野生型ゲノムＤＮＡの増幅セグメントから溶解する前記プローブの溶解プロファイルとを取得するステップと、

（ｈ）前記サンプル・ゲノムＤＮＡについての前記溶解プロファイルを前記野生型ゲノムＤＮＡについての前記溶解プロファイルと比較し、これらの差が前記サンプル・ゲノムＤＮＡにおける第Ｖ因子ライデン変異の存在を表わすステップと、

を含むことを特徴とする方法。

８８．前記転移オリゴヌクレオチドはオリゴヌクレオチド・プライマーの対の一方であることを特徴とする請求項８７に記載の方法。

８９．前記共鳴エネルギー転移対はフルオレセインとＣｙ５又はＣｙ５．５を含むことを特徴とする請求項８８に記載の方法。

９０．前記オリゴヌクレオチド・プライマーが配列ＩＤ no:１１及び配列ＩＤ no:１２であることを特徴とする請求項８９に記載の方法。

９１．配列ＩＤ no:１１はＣｙ５又はＣｙ５．５で標識されることを特徴とする請求項９０に記載の方法。

９２．前記オリゴヌクレオチド・プローブが配列ＩＤ no:１３であることを特徴とする請求項９０に記載の方法。

９３．配列ＩＤ no:１３がフルオレセインで標識されることを特徴とする請求項９０に記載の方法。

９４．前記共鳴エネルギー転移供与体及び共鳴エネルギー転移受容体がヌクレオ

チド残基に結合されて、前記プローブと転移オリゴヌクレオチドが前記増幅セグメントにハイブリダイゼーションされる場合約１５ヌクレオチド残基以上離れないようにすることを特徴とする請求項８７に記載の方法。

９５．前記共鳴エネルギー転移供与体及び共鳴エネルギー転移受容体がヌクレオチド残基に結合されて、前記プローブと転移オリゴヌクレオチドが前記増幅セグメントにハイブリダイゼーションされる場合約４～６ヌクレオチド残基だけ離れるようにすることを特徴とする請求項９４に記載の方法。

９６．前記転移オリゴヌクレオチドは前記オリゴヌクレオチド・プライマーの一方ではないことを特徴とする請求項８６に記載の方法。

９７．前記共鳴エネルギー転移対はフルオレセインとＣｙ５又はＣｙ５．５を含むことを特徴とする請求項９６に記載の方法。

９８．前記オリゴヌクレオチド・プライマーが配列ＩＤ no:１１と配列ＩＤ no:１２であることを特徴とする請求項９７に記載の方法。

９９．前記オリゴヌクレオチド・プローブが配列ＩＤ no:１３であることを特徴とする請求項９８に記載の方法。

１００．配列ＩＤ no:１３がフルオレセインで標識されることを特徴とする請求項９９に記載の方法。

１０１．前記転移オリゴヌクレオチドがＣｙ５又はＣｙ５．５で標識されることを特徴とする請求項１００に記載の方法。

１０２．前記共鳴エネルギー転移供与体及び前記共鳴エネルギー転移受容体がヌクレオチド残基に結合され、前記プローブと転移オリゴヌクレオチドが前記増幅セグメントにハイブリダイゼーションされる場合に２５ヌクレオチド残基以上離れないようにすることを特徴とする請求項１０１に記載の方法。

１０３．前記共鳴エネルギー転移供与体及び前記共鳴エネルギー転移受容体がヌクレオチド残基に結合され、前記プローブと転移オリゴヌクレオチドが前記増幅セグメントにハイブリダイゼーションされる場合に約０～５ヌクレオチド残基以上離れないようにすることを特徴とする請求項１０２に記載の方法。

１０４．前記共鳴エネルギー転移供与体及び前記共鳴エネルギー転移受容体がヌ

クレオチド残基に結合され、前記プローブと転移オリゴヌクレオチドが前記増幅セグメントにハイブリダイゼーションされる場合に約０～２ヌクレオチド残基以上離れないようにすることを特徴とする請求項１０３に記載の方法。

１０５．前記共鳴エネルギー転移供与体及び前記共鳴エネルギー転移受容体がヌクレオチド残基に結合され、前記プローブと転移オリゴヌクレオチドが前記増幅セグメントにハイブリダイゼーションされる場合に１ヌクレオチド残基だけ離れるようにすることを特徴とする請求項１０４に記載の方法。

１０６．溶解プロファイルにおける相違が少なくとも約２℃の熱溶解温度における相違を表わすことを特徴とする請求項８７に記載の方法。

１０７．配列ＩＤ no:１１のヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチド。

１０８．配列ＩＤ no:１２のヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチド。

１０９．配列ＩＤ no:１３のヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチド。

１１０．　核酸ハイブリダイゼーションを分析するための方法であって、

（ａ）分析すべき核酸サンプルと核酸結合蛍光体とを含む混合物を提供するステップと、

（ｂ）温度を≧毎秒０．１℃の速度で変化させながら蛍光をモニタするステップと、

を含むことを特徴とする方法。

１１１．前記核酸結合蛍光染料がＳＹＢＲ™グリーンＩであることを特徴とする請求項１１０に記載の方法。

１１２．前記核酸結合蛍光体はオリゴヌクレオチド・プローブの対を含み、前記プローブの一方が蛍光共鳴エネルギー転移対の供与体で標識され前記プローブの他方が受容体で標識されることを特徴とする請求項１１０に記載の方法。

１１３．前記プローブの一方がポリメラーゼ連鎖反応増幅用のプライマーであることを特徴とする請求項１１２に記載の方法。

１１４．　未知の量の核酸を含むサンプルの初期コピー数を定量する方法であって、

（ａ）ポリメラーゼ連鎖反応により既知の濃度の少なくとも一つの標準を、前

記標準と核酸結合蛍光体とを含む混合物中で増幅するステップと、

（ｂ）サイクル数の関数として蛍光を測定して一組のデータ点を得るステップと、

（ｃ）初期核酸濃度とサイクル数の関数として蛍光を記述する任意の所定の式に前記データ点を当てはめるステップと、

（ｄ）前記サンプルと前記核酸結合蛍光体とを含む混合物中で未知の量の核酸を含む前記サンプルを増幅してこれの蛍光をモニタするステップと、

（ｅ）ステップ（ｃ）で求めた式から初期核酸濃度を決定するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

１１５．前記核酸結合蛍光染料がＳＹＢＲ™グリーンＩであることを特徴とする請求項１１４に記載の方法。

１１６．前記核酸結合蛍光体はオリゴヌクレオチド・プローブの対を含み、その一方が蛍光共鳴エネルギー転移対の供与体で標識され他方が受容体で標識されることを特徴とする請求項１１４に記載の方法。

１１７．前記プローブの一方が増幅用プライマーであることを特徴とする請求項１１６に記載の方法。

１１８．放射スペクトルを有する供与体蛍光物質と吸収スペクトルを有し消光係数が１００，０００$M^{-1}cm^{-1}$より大きい受容体蛍光物質とを含み、前記供与体蛍光物質の放射スペクトルと前記受容体蛍光物質の吸収スペクトルが２５％以下でオーバラップすることを特徴とする蛍光共鳴エネルギー転移対。

１１９．前記供与体蛍光物質がフルオレセインであり前記受容体蛍光物質がＣｙ５又はＣｙ５．５であることを特徴とする蛍光共鳴エネルギー転移対。

１２０．　生物学的サンプルの標的ＤＮＡ配列を分析するための方法であって、

核酸結合蛍光体の存在下にポリメラーゼ連鎖反応によって前記標的配列を増幅し、前記ポリメラーゼ連鎖反応には前記標的とされる核酸配列に対する熱安定性ポリメラーゼ及びプライマーを前記生物学的サンプルに添加して少なくとも変性温度と延長温度の間で前記生物学的サンプルを熱サイクルするステップを含むステップと、

前記核酸結合蛍光体により吸収される波長の光によって前記サンプルを励起するステップと、

前記サンプルの温度が変化する際に前記核酸結合蛍光体からの温度依存性蛍光をモニタするステップと、

を含むことを特徴とする方法。

１２１．前記核酸結合蛍光体は二重鎖核酸結合蛍光染料を含むことを特徴とする請求項１２０に記載の方法。

１２２．前記二重鎖核酸結合蛍光染料がＳＹＢＲ™グリーンＩであることを特徴とする請求項１２１に記載の方法。

１２３．前記温度依存性蛍光を用いて前記増幅生成物を同定することを特徴とする請求項１２２に記載の方法。

１２４．前記増幅生成物が溶解曲線の分析によって同定されることを特徴とする請求項１２３に記載の方法。

１２５．２種類又はそれ以上の増幅生成物の相対量を溶解曲線の分析によって求めることを特徴とする請求項１２４に記載の方法。

１２６．溶解曲線より下の領域が多重ガウス曲線の和の非線形最小自乗法回帰で見付けられることを特徴とする請求項１２４に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の名称　　ＰＣＲ中のハイブリダイゼーションのモニタリング

関連出願への相互参照

自動ポリメラーゼ連鎖反応装置と題する１９９０年６月４日付米国特許出願第０７／５３４，０２９号（現在は破棄されている）の部分継起出願である高速熱サイクル装置と題する１９９２年１月２日付米国特許出願第０７／８１５，９６６号（現在は破棄されている）の部分継起出願である高速熱サイクル装置と題する１９９４年１月１０日付米国特許出願第０８／１７９，９６９号（現在の米国特許第５，４５５，１７５号）の部分継起出願である生物学的サンプルの高速熱サイクルのための方法と題する１９９５年１０月２日付米国特許出願第０８／５３７，６１２号の部分継起出願であるＰＣＲ処理をモニタするためのシステム及び方法と題する１９９６年６月４日付米国特許出願第０８／６５８，９９３号の部分継起出願である第Ｖ因子ライデン変異を検出するための方法と題する１９９７年３月１７日付米国特許出願第０８／８１８，２６７号。上記出願の各々はその全体で本明細書において参照として個別に各々含まれる。生物学的処理を実施しモニタするためのシステム及びその方法と題し、ユタ大学研究財団が出願人でカール・Ｔ・ウィットワー、カーク・Ｍ・ライリー、ランディ・Ｐ・ラスムッセン、デビッド・Ｒ・ヒルヤードを米国における発明者兼出願人とする同時出願中の１９９７年６月４日付米国事務局（ＲＯ／ＵＳ）受付ＰＣＴ出願出願番号ＰＣＴ／ＵＳ９７／＿＿もその全体を本明細書の参照に含む。

発明の背景

本発明は一般にポリメラーゼ連鎖反応に関連したハイブリダイゼーションにより得られる蛍光信号を観察することに関する。さらに詳しくは、本発明はＰＣＲ実施中および／または直後に蛍光によるハイブリダイゼーションの観察及びこの情報を生成物の同定、配列変化検出及び定量に使用することに関する。

ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）は分子生物学の基本であり臨床検査的に第１の実用分子技術である。その有用性や一般性にもかかわらず、ＰＣＲについての現在の理解は非常に進んでいるとはいえない。増幅が成功するのに充分な条件は

試行錯誤によって見つけ出す必要があり最適化は経験に頼つている。当業者であっても工程についての分かり易い又は予測的理論なしで強力な技術を使用する必要がある。

ＰＣＲはサンプルの熱サイクルによって行なわれ、ＤＮＡを変性（分離）し、特定プライマーを付着（アニーリング）し、複製を行なわしめる（拡張）。ＰＣＲの１サイクルは一般に２から８分で行なわれ、３０サイクルの増幅には１から４時間を必要とする。大抵のＰＣＲ装置におけるサンプル温度応答は変性、アニーリング、拡張に必要な時間に比べれば非常に遅い。ＰＣＲでの物理的（変性及びアニーリング）及び酵素的（拡張）反応は非常に迅速に起こる。ＰＣＲの増幅時間は数時間から１５分以内に減少可能である。本明細書において参照に含まれる１９９５年１０月２日付米国特許出願第０８／５３７，６１２号では、このような高速サイクル・システムを開示している。高速サイクル技術は表面積対容積比が大きなサンプル容器たとえば毛細管のサンプルで可能な高速温度応答及び温度均一性によって可能になる。さらに詳しい情報については、Ｋ．Ｂ．ムリス、Ｆ．フェレ、Ｒ．Ａ．ギブス著、ポリメラーゼ連鎖反応、バークハウザー出版（１９９４年）、１７４～１８１ページの、Ｃ．Ｔ．ウィットワー、Ｇ．Ｂ．リード、Ｋ．Ｍ．ライリー共著、高速サイクルＤＮＡ増幅も参照のこと。温度均一性の改善によりＰＣＲの時間及び温度条件は良く定義され理解されるようになる。温度均一性の改善は増幅中のＰＣＲをモニタするために使用される分析技術の精度も向上させる。

フルオロメトリは分子生物学に多くの用途を持つ高感度で汎用の技術である。臭化エチジウムはゲル電気泳動により分離される核酸のサイズ分布を視覚化するために長年の間使用されてきた。通常はゲルを紫外光で透過照明すると二重鎖核酸の赤色蛍光が観察される。さらに詳しくは、臭化エチジウムは増幅が完了した後でＰＣＲの生成物を分析するために共通に使用される。さらに、本明細書で参照に含まれるヒグチ＆ワトソンのＥＰＡ特許出願第０６４０８２８Ａ１号では増幅中に臭化エチジウムを使用して各サイクルで蛍光を測定することによる二重鎖ＤＮＡの量をモニタする方法を開示している。蛍光強度は温度に逆比例して上下

し、アニーリング／拡張温度（５０℃）で最大、また変性温度（９４℃）で最低だったと記載された。最大の蛍光は各サイクルでＤＮＡ量の尺度として取得された。ヒグチ＆ワトソンの出願はハイブリダイゼーション発生をモニタするために蛍光を使用することを教示しておらず、ハイブリダイゼーションの範囲を追跡するため異なる温度での蛍光を観察することも示唆していない。さらに、ヒグチ＆ワトソンはＰＣＲ生成物の同定又は定量のためにＰＣＲ生成物ハイブリダイゼーションの温度依存性を使用することも教示又は示唆し得なかった。

しかしヒグチ＆ワトソン出願は、ゲルファンドらへの米国特許第５、２１０，０１５号に開示されているように、ある種のＤＮＡポリメラーゼの５’エクソヌクレアーゼ活性で水解される場合に蛍光を発生する二十標識プローブ・システムを含む他の蛍光を使用する方法を記述している。これらのプローブから観察される蛍光は主として二つの蛍光物質の間でプローブの水解に依存する。ＰＣＲ生成物の量は各サイクル毎に１回蛍光を測定することで推定される。これらのプローブのハイブリダイゼーションは水解が発生する必要があるように見えるが、蛍光信号は主としてプローブの水解から得られるもので、ハイブリダイゼーションによるものではなく、対向する端部に蛍光染料を付けたオリゴヌクレオチド・プローブはＰＣＲ生成物と核酸ハイブリダイゼーションを検出するために有用な消光プローブ・システムを提供する（Ｋ．Ｊ．リバックら、4 PCR Meth. Appl. 357–362(1995)）。蛍光でプローブハイブリダイゼーションの温度依存に追従しＰＣＲ生成物の配列変化を同定することにはなんの示唆もされていない。

同定のための相補鎖に対する核酸の特異的ハイブリダイゼーションは多くの異なるフォーマットで開発されてきた。たとえば、制限酵素による消化の後で、ゲノムＤＮＡをサイズ的に分割ハイブリッド化してサザンブロッティングのプローブとすることができる。別の例として、単一の塩基変異が対立遺伝子特異性オリゴヌクレオチドによる「ドット・ブロット」で検出できる。通常、ハイブリダイゼーションは単一温度で数分から数時間にわたって実施し必要な弁別を行なう。これ以外に、蛍光技術を用いることで温度を変化させながらハイブリダイゼーション範囲を動的にモニタすることができる。たとえば、蛍光溶解曲線はハイブリ

ダイゼーションをモニタするために使用されてきた。Ｌ．Ｅ．モリソン＆Ｌ．Ｍ．ストールス、Sensitive fluorescence-based thermodynamic and kineticmeasurements of DNA hybridization in solution, 32 Biochemistry 3095-3104, (1993)。温度スキャン・レートは一般に毎時１０℃またはそれ以下で、一部には蛍光光度計キュベットの熱容量が大きいことによる。

ハイブリダイゼーションをモニタするための現行方法は多くの時間を必要とする。ハイブリダイゼーションが数時間ではなく数秒で起これば、高速サイクルＰＣＲの最中であってもハイブリダイゼーションはＰＣＲ増幅中にモニタできる。ＰＣＲ中のハイブリダイゼーションモニタリングの多くの用途は、本明細書で完全に開示するように、生成物の同定と定量、配列変化の検出、蛍光フィードバックによる温度サイクル・パラメータの自動制御を含む。

前述のように、従来技術では温度サイクルをゆっくりとまた経験的に行なってきた。ハイブリダイゼーションによるＰＣＲ生成物の分析が必要な場合、さらに時間のかかるステップが必要である。つまり、ＰＣＲ中のハイブリダイゼーションをモニタし、反応が行なわれている最中につまりサンプル操作なしで温度サイクルの最中又は直後に反応を分析する方法を提供するのは当該技術における大きな進歩である。ＰＣＲ中のハイブリダイゼーションをモニタすることで、ＰＣＲが機能することのできる基本原理に追従しまた使用して増幅中の反応を分析し最適化することができる。

発明の簡単な概要

本発明の目的はＰＣＲ中の生成物ハイブリダイゼーションをモニタするための二重鎖特異性DNA染料を提供することである。

本発明の別の目的は蛍光溶解曲線によるＰＣＲ増幅生成物を同定するためのシステムを提供することである。

本発明のさらなる目的は二重鎖特異性ＤＮＡ染料によるＰＣＲ定量感度の改善のための方法を提供することである。

本発明のさらに別の目的は溶解曲線によりＰＣＲで増幅された特定生成物の量を決定して二重鎖特異性ＤＮＡ染料により検出された非特異的増幅を補正するこ

とである。

本発明のさらに別の目的は二重鎖特異性ＤＮＡ染料による異なったＰＣＲ生成物の相対的定量の方法を提供することである。

本発明の別の目的は二重鎖特異性ＤＮＡ染料の存在下に生成物のアニーリング動態による生成物定量の方法を提供することである。

本発明のさらに別の目的はプライマーおよび／またはプローブのハイブリダイゼーションをモニタするための新規な共鳴エネルギー転移対を提供することである。

本発明のさらに別の目的は共鳴エネルギー転移対を使用する生成物に対するプローブのアニーリング動態による生成物定量の方法を提供することである。

本発明の目的はＰＣＲ増幅中に各サイクルのハイブリダイゼーション・プローブ又はプローブ群の蛍光を追跡することにより初期テンプレート・コピー数を決定する方法を提供することである。

本発明の別の目的はＰＣＲプライマーと中間部でハイブリダイゼーションする二つの標識プローブの間での共鳴エネルギー転移によるＰＣＲ生成物の均質な検出のためのシステムを提供することである。

本発明のさらに別の目的は１つの標識プライマーとＰＣＲプライマーに中間部でハイブリダイゼーションする１つの標識プローブの間の共鳴エネルギー転移によりＰＣＲ生成物の均質な検出のためのシステムを提供することである。

本発明のさらなる目的は共鳴エネルギー転移とプローブ溶解曲線によるＰＣＲプライマーへの中間部配列変化の検出のためのシステムを提供することである。

本発明のさらなる目的はプローブ溶解曲線による異なったＰＣＲ生成物の相対定量のためのシステムを提供することである。

本発明のさらに別の目的は蛍光対サイクル数プロットを曲線適合することで初期テンプレートのコピー数を決定するための方法を提供することである。

本発明のさらに別の目的はＰＣＲを高速で行なうためと反応を連続的にモニタし反応が進行中に反応パラメータを調節するためのシステム及びその方法を提供することである。

本発明のさらに別の目的は合成核酸アナログ又は誘導体による、たとえばペプチド核酸（ＰＮＡ）により、蛍光化合物でこれらも又標識できる場合に核酸プローブを置き換えることである。

本発明の上記及びその他の目的と利点は後述の詳細な説明と請求項とからさらに完全に明らかになるか、または本発明の実施により学習されよう。

本発明はＰＣＲ増幅と分析に必要な総時間数を従来技術に比べてとくに減少する一方で同時に増幅条件を最適化することにより反応量を有意に増加するオプションを可能にするものである。

本発明はＤＮＡ増幅の連続的蛍光モニタのための方法とその応用を提供する。必要とされる機材は光学的構成要素と構造を組み合わせて高速温度サイクルを提供し各種の異なる蛍光技術によるＤＮＡ増幅を連続的にモニタする。１つの図示した実施例において、蛍光は単一サンプルから連続的に、又はこれ以外ではサンプル全部に同時に高速熱サイクルが行なわれるようにした回転カローセル上の多数サンプルから連続的に取得する。関連装置についてのさらなる情報は上記で参照した米国特許出願に見ることができる。

本発明の１つの側面において、ＤＮＡ増幅中の蛍光は、１）二重鎖特異性染料ＳＹＢＲ™グリーンＩ、及び２）ハイブリダイゼーション・プローブ付きＣｙ５™及びＣｙ５．５™へのフルオレセインの共鳴エネルギー転移によりモニタされた。サイクル毎に１回取得した蛍光データで初期テンプレート・コピー数の定量が行なえる。

さらに、サイクルあたり１回の蛍光測定とは対照的に、各サイクルの間中連続的に温度、時間、蛍光をモニタし、三次元螺旋を作成する本発明の実施例が開示される。この三次元螺旋は温度対時間、蛍光対時間、蛍光対温度プロットに還元可能である。ハイブリダイゼーション・プローブからの蛍光の蛍光対温度プロットは生成物の配列変化を検出するために使用できる。これらの配列変化は突然変異又は多形性等では自然的、定量ＰＣＲの工学的変更テンプレート等では人工的なものである。

本発明の別の側面において、蛍光モニタリングを用いて二重鎖特異性ＤＮＡ特

異的染料による蛍光モニタリングによるＰＣＲ中の生成物溶解曲線を取得する。熱サイクラが生成物分解温度を通して過熱する際に温度の関数として蛍光をプロットすることで、ＰＣＲ生成物溶解曲線を得る。このＤＮＡ溶解曲線の形状と位置はＧＣ／ＡＴ比及び配列の関数であり、溶解温度２℃以内で分離された増幅生成物を区別するために使用できる。所望する生成物は、プライマー・ダイマーを含む所望しない生成物から識別できる。溶解曲線の分析を用いると定量ＰＣＲのダイナミックレンジを拡大し、また多重増幅での異なる生成物を識別することができる。二重鎖染料、生成物変性、アニーリング、拡張の使用は各サイクル内で継続できる。蛍光の連続モニタリングによって温度サイクル中の溶解曲線と生成物アニーリング曲線の取得ができるようになる。

本発明は３０分以内での、さらに望ましくは１５分以内で、またもっとも望ましくは10分以内で、蛍光モニタリングによる増幅と分析を組み合わせた高速サイクルＰＣＲのための試薬ならびに方法を提供する。

生物学的サンプルの標的ＤＮＡ配列を分析するための方法は、

前記標的配列の隣接領域にハイブリダイゼーションする２種類の核酸プローブの存在下でポリメラーゼ連鎖反応法により前記標的配列を増幅し、前記プローブの一方は受容体蛍光物質で標識し前記プローブの他方は蛍光エネルギー転移対の供与体蛍光物質で標識して前記２種類のプローブと前記標的配列とのハイブリダイゼーション時に前記供与体と受容体蛍光物質は互いに２５核酸以内にあり、前記ポリメラーゼ連鎖反応には前記標的核酸配列に対する熱安定性ポリメラーゼ及びプライマーを前記生物学的サンプルに添加するステップと、少なくとも変性温度と拡張温度との間で前記生物学的サンプルを熱サイクルするステップとを含む増幅ステップと、

前記供与体蛍光物質によって吸収される波長の光で前記生物学的サンプルを励起して前記蛍光エネルギー転移対からの放射を検出するステップと、

を含むことを特徴とする。

生物学的サンプルの標的ＤＮＡ配列を分析するための方法は、

前記標的配列の隣接領域にハイブリダイゼーションする２種類の核酸プローブ

の存在下でポリメラーゼ連鎖反応法により前記標的配列を増幅し、前記プローブの一方は受容体蛍光物質で標識し前記プローブの他方は蛍光エネルギー転移対の供与体蛍光物質で標識して前記２種類のプローブと前記標的配列とのハイブリダイゼーション時に前記供与体と受容体蛍光物質は互いに２５核酸以内にあり、前記ポリメラーゼ連鎖反応には前記標的核酸配列に対する熱安定性ポリメラーゼ及びプライマーを前記生物学的サンプルに添加するステップと、少なくとも変性温度と拡張温度との間で前記生物学的サンプルを熱サイクルするステップとを含む増幅ステップと、

前記供与体蛍光物質によって吸収される波長の光で前記生物学的サンプルを励起するステップと、

前記蛍光エネルギー転移対からの温度依存性蛍光をモニタするステップと、

を含むことを特徴とする。

生物学的サンプルの標的核酸配列のポリメラーゼ連鎖反応増幅をリアルタイムでモニタする方法は、

（ａ）前記生物学的サンプルに２種類の核酸プライマーと核酸プローブとの有効量を添加し、前記プライマーの一方と前記プローブは各々が受容体蛍光物質と供与体蛍光物質とを含む蛍光エネルギー転移対の一方の構成要素で標識され、前記標識されたプローブは前記標識されたプライマーの１５ヌクレオチド以内の標的核酸配列の増幅コピーとハイブリダイゼーションするステップと、

（ｂ）ポリメラーゼ連鎖反応により前記標的核酸配列を増幅するステップと、

（ｃ）前記供与体蛍光物質によって吸収される選択波長の光で前記生物学的サンプルを照明するステップと、

（ｄ）前記サンプルの蛍光放射を検出するステップと、

を含むことを特徴とする。

生物学的サンプルの標的核酸配列を増幅する方法の改良は、

（ａ）前記生物学的サンプルに核酸結合性蛍光体の有効量を添加するステップと、

（ｂ）ポリメラーゼ連鎖反応を用いて前記標的核酸配列を増幅するステップで

あって、初期の所定温度と時間パラメータを用いて前記生物学的サンプルを熱サイクルし、さらに

（ｉ）前記ポリメラーゼ連鎖反応中の蛍光体によって吸収される光の選択波長で前記生物学的サンプルを照明するステップと、

（ｉｉ）前記サンプルからの蛍光をモニタして前記ポリメラーゼ連鎖反応の最適温度及び時間パラメータを決定するステップと、

（ｉｉｉ）前記蛍光により前記初期温度及び時間を調節するステップと

を含むことを特徴とする。

図示した１つの実施例において、蛍光体は二重鎖特異性ＤＮＡ結合染料を含み、別の図示した実施例においては蛍光体は標的核酸配列にハイブリダイゼーションする蛍光標識オリゴヌクレオチド・プローブを含む。

生物学的サンプルの標的核酸配列を検出するための方法は、

（ａ）前記生物学的サンプルに前記標的核酸配列とハイブリダイゼーションするオリゴヌクレオチド・プローブの対の有効量を添加し、前記プローブの一方は受容体蛍光物質で標識され、他方のプローブは蛍光エネルギー転移対の供与体蛍光物質で標識され、前記供与体蛍光物質の放射スペクトルと前記受容体蛍光物質の吸収スペクトルは２５％未満で重なり合い、前記受容体蛍光物質は１００，０００$M^{-1}cm^{-1}$より大きいピーク吸光係数を有し２種類のプローブのハイブリダイゼーション時には前記供与体蛍光物質と受容体蛍光物質は互いに２５ヌクレオチド以内にあるステップと、

（ｂ）前記供与体蛍光物質によって吸収される光の選択波長で前記生物学的サンプルを照明するステップと、

（ｃ）前記生物学的サンプルの放射を検出するステップと、

を含むことを特徴とする。

図示した共鳴エネルギー転移対は供与体としてフルオレセイン、又受容体としてＣｙ５又はＣｙ５．５を含む。

生物学的サンプルの標的核酸配列のポリメラーゼ連鎖反応増幅をリアルタイムでモニタする方法は、

前記標的配列の隣接領域とハイブリダイゼーションする２種類の核酸プローブの存在下でポリメラーゼ連鎖反応により前記標的配列を増幅し、前記プローブの一方は受容体蛍光物質で標識され前記他方のプローブは蛍光エネルギー転移対の供与体蛍光物質で標識されて、前記２種類のプローブと前記標的配列のハイブリダイゼーション時に、前記供与体蛍光物質と前記受容体蛍光物質は互いに２５ヌクレオチド以内にあり、前記ポリメラーゼ連鎖反応は前記標的核酸配列の熱安定性ポリメラーゼとプライマーを前記生物学的サンプルに添加するステップと、少なくとも変性温度と拡張温度の間で前記生物学的サンプルを熱サイクルするステップとを含むステップと、

前記供与体蛍光物質により吸収される波長の光で前記生物学的サンプルを励起して前記生物学的サンプルからの放射を検出するステップと、

前記蛍光エネルギー転移対からの温度依存性蛍光をモニタするステップと

を含むことを特徴とする。

生物学的サンプルにおける標的核酸配列のポリメラーゼ連鎖反応増幅をリアルタイムでモニタする方法は、　ＳＹＢＲ™グリーンＩの存在下にポリメラーゼ連鎖反応により前記標的配列を増幅し、前記ポリメラーゼ連鎖反応は前記標的核酸配列の熱安定性ポリメラーゼとプライマーとを前記生物学的サンプルに添加するステップと、少なくとも変性温度と拡張温度の間で前記生物学的サンプルを熱サイクルするステップを含むステップと、

前記ＳＹＢＲ™グリーンＩによって吸収される波長の光で前記生物学的サンプルを励起して前記生物学的サンプルからの放射を検出するステップと、

前記ＳＹＢＲ™グリーンＩからの温度依存性蛍光をモニタするステップとを含むことを特徴とする。望ましくは、前記モニタするステップは前記増幅された標的配列の溶解プロファイルを決定するステップを含む。

生物学的サンプルの標的ＤＮＡ配列を分析するための方法は、

（ａ）２種類の核酸プライマーと核酸プローブとの有効量を前記生物学的サンプルに添加し、前記プライマーの一方と前記プローブは各々が受容体蛍光物質と供与体蛍光物質からなる蛍光エネルギー転移対の一方の構成要素で標識され、前

記標識されたプローブは前記標識されたプライマーから１５ヌクレオチド以内の前記標的核酸配列の増幅コピーとハイブリダイゼーションするステップと、

（ｂ）ポリメラーゼ連鎖反応により前記標的核酸配列を増幅するステップと、

（ｃ）前記供与体蛍光物質によって吸収される選択波長の光で前記生物学的サンプルを照明して前記サンプルの蛍光放射を検出するステップとを含むことを特徴とする。別の図示した実施例において、本方法はさらに、望ましくは前記増幅した標的配列の溶解温度を決定することによって、前記サンプルの温度依存性蛍光をモニタするステップを含む。

第１の核酸において選択した配座での相違を第２の核酸と比較して検出する方法は、

（ａ）ポリメラーゼ連鎖反応により、前記第１の核酸の選択したセグメントと前記第２の核酸のこれに対応するセグメントとを増幅するように構成したオリゴヌクレオチド・プライマーの対を提供し、前記選択したセグメントとこれに対応するセグメントは各々が前記選択した配座を含み、前記選択した配座のコピーを含む増幅生成物が得られるようにするステップと、

（ｂ）オリゴヌクレオチド・プローブの対を提供し、前記プローブの一方は受容体蛍光物質で標識し前記プローブの他方は蛍光共鳴エネルギー転移対の供与体蛍光物質で標識しておき前記２種類のプローブと前記増幅生成物のハイブリダイゼーション時に前記供与体蛍光物質と受容体蛍光物質が共鳴エネルギー転移の関係にあるようにし、前記プローブの一方は前記増幅生成物とハイブリダイゼーションするように構成されて前記プローブの前記一方が前記選択された配座にまたがり前記第１の核酸において前記第２の核酸の溶解プロファイルとは識別可能な差が存在する場合に溶解プロファイルを示すようにするステップと、

（ｃ）前記第１の核酸の前記選択したセグメントと前記第２の核酸の前記これ

に対応するセグメントとを有効量のプローブの存在下にポリメラーゼ連鎖反応によって増幅し、増幅された選択セグメントと増幅された対応セグメントが得られるようにし、その少なくとも一部分は共鳴エネルギー転移関係にある蛍光共鳴エネルギー転移対でこれらにハイブリダイゼーションされた両方のプローブを有す

るステップと、

（ｄ）ハイブリダイゼーションされたプローブを有する前記増幅された選択セグメントと前記増幅された対応セグメントとを選択された波長の光で照明して前記蛍光共鳴エネルギー転移対による蛍光を顕在化させるステップと、

（ｅ）温度の関数として蛍光放射を測定して第１の核酸の前記増幅選択セグメトから溶解する前記一方のプローブの第１の溶解プロファイルと第２の核酸の前記増幅対応セグメトから溶解する前記一方のプローブの第２の溶解プロファイルにおいて決定するステップと、

（ｆ）前記第１の溶解プロファイルを前記第２の溶解プロファイルと比較し、ここでの相違が前記サンプル核酸における相違の存在を示すようにするステップと、

を含むことを特徴とする。

第１の核酸において第２の核酸と比較して選択した配座での相違を検出する方法は、

（ａ）ポリメラーゼ連鎖反応により、前記第１の核酸の選択されたセグメントと前記第２の核酸のこれに対応するセグメントとを増幅するように構成したオリゴヌクレオチド・プライマーの対を提供し、前記選択セグメントと対応セグメントの各々が前記選択された配座を含み、前記選択された配座のコピーを含む増幅生成物を得るようにするステップと、

（ｂ）オリゴヌクレオチド・プローブを提供し、前記プライマーの一方と前記プローブとが各々供与体蛍光物質と受容体蛍光物質とを含む蛍光エネルギー転移対の一方の構成要素で標識され、前記標識されたプローブと標識されたプライマーは前記増幅生成物とハイブリッド化して前記供与体蛍光物質と受容体蛍光物質とが共鳴エネルギー転移関係に置かれるようにし、前記プローブは前記増幅生成物とハイブリッド化するように構成されて前記プローブは前記選択された配座にまたがり前記第２の核酸の溶解プロファイルから識別できる前記第１の核酸に相違が存在する場合には溶解プロファイルを示すステップと、

（ｃ）前記第１の核酸の選択セグメントと前記第２の核酸のこれに対応するセ

グメントとをポリメラーゼ連鎖反応により有効量のプライマー及びプローブの存在下にて増幅し増幅された選択セグメントと増幅された対応セグメントを得るようにし、その少なくとも一部分は共鳴エネルギー転移関係にある前記蛍光共鳴エネルギー転移対によりこれらにハイブリダイゼーションされた標識プライマー及びプローブを有するステップと、

（ｄ）前記標識プライマー及びプローブがハイブリッド化された前記増幅選択セグメントと前記増幅対応セグメントを選択した波長で照明して前記蛍光共鳴エネルギー転移対による蛍光を顕在化するステップと、

（ｅ）前記第１の核酸の前記増幅選択セグメントから溶解する前記プローブの第１の溶解プロファイルと前記第２の核酸の前記増幅対応セグメントから溶解する前記プローブの第２の溶解プロファイルとを決定するステップと、

（ｆ）前記第１の溶解プロファイルと前記第２の溶解プロファイルとを比較して、相違が前記サンプル核酸に置ける相違の存在を表わすステップと、

を含むことを特徴とする。

個人のゲノムにおいて選択された配座でのヘテロ接合性を検出する方法であって、前記ゲノムは突然変異性対立遺伝子とこれに対応する基準対立遺伝子とを含み、その各々が選択された配座を含み、

（ａ）前記個人からサンプルとなるゲノムＤＮＡを採得するステップと、

（ｂ）ポリメラーゼ連鎖反応により前記突然変異対立遺伝子の第１の選択したセグメントと前記これに対応する基準対立遺伝子の第２の選択したセグメントを増幅するように構成されたオリゴヌクレオチド・プライマーの対を提供し、前記第１と第２の選択されたセグメントとの両方ともが前記選択された配座を含むステップと、

（ｃ）オリゴヌクレオチド・プローブの対を提供し、前記プローブの一方は受

容体蛍光物質で標識し前記プローブの他方は蛍光共鳴エネルギー転移対の供与体蛍光物質で標識して前記増幅した第１と第２の選択セグメントと前記２種類のプローブのハイブリダイゼーション時に前記プローブの一方は前記選択された配座にまたがり前記増幅された第２の選択セグメントによる第２の溶解プロファイル

から識別可能な前記増幅された第１の選択セグメントによる第１の溶解プロファイルを示すようにするステップと、

（ｄ）ポリメラーゼ連鎖反応により有効量のプローブの存在下でサンプル・ゲノムＤＮＡの前記第１と第２の選択セグメントを増幅して増幅された第１と第２の選択セグメントを得るようにし、少なくともその一部分が両方とも共鳴エネルギー転移関係にある蛍光共鳴エネルギー転移対によりこれらにハイブリダイゼーションされたプローブを有するステップと、

（ｅ）選択した波長の光によりハイブリダイゼーションされたプローブを有する前記増幅された第１と第２の選択セグメントを照明して、前記供与体と受容体による蛍光を顕在化するステップと、

（ｆ）温度の関数として蛍光放射を測定して、前記増幅した第１の選択セグメントから溶解する前記一方のプローブの第１の溶解プロファイルと前記増幅した第２の選択セグメントから溶解する前記一方のプローブの第２の溶解プロファイルとを決定するステップと、

（ｇ）前記第１の溶解プロファイルと前記第２の溶解プロファイルとを比較して、識別可能な溶解プロファイルが前記サンプル・ゲノムＤＮＡのヘテロ接合性を表わすようにするステップと、

を含むことを特徴とする。

個人のゲノムにおいて選択された配座でのヘテロ接合性を検出する方法であって、前記ゲノムは突然変異対立遺伝子とこれに対応する基準対立遺伝子とを含み、各々が選択された配座を含み、

（ａ）前記個人からサンプル・ゲノムＤＮＡを採得するステップと、

（ｂ）ポリメラーゼ連鎖反応によって前記突然変異対立遺伝子の第１の選択されたセグメントと前記これに対応する基準対立遺伝子の第２の選択されたセグメントを増幅するように構成されたオリゴヌクレオチド・プライマーの対を提供し、前記第１と第２の選択セグメントにはどちらも前記選択された配座を含むステップと、

（ｃ）オリゴヌクレオチド・プローブを提供し、前記プライマーの一方と前記

プローブは各々供与体蛍光物質と受容体蛍光物質とを含む蛍光エネルギー転移対の一方の構成要素で標識され、前記標識されたプローブと標識されたプライマーは前記増幅された第１と第２の選択セグメントにハイブリダイゼーションして前記プローブの一方が前記選択された配座にまたがり前記増幅された第２の選択セグメントによる第２の溶解プロファイルから識別可能な前記増幅された第１の選択セグメントによる第１の溶解プロファイルを示すようにするステップと、

（ｄ）有効量のプライマー及びプローブの存在下でポリメラーゼ連鎖反応によりサンプル・ゲノムＤＮＡの第１と第２の選択されたセグメントを増幅して増幅された第１と第２の選択セグメントを得るようにし、少なくともその一部分は共鳴エネルギー転移関係にある蛍光共鳴エネルギー転移対によりこれらにハイブリダイゼーションされた標識プライマー及びプローブを有するようにするステップと、

（ｅ）前記標識したプライマーとプローブがハイブリダイゼーションされている前記増幅した第１と第２の選択セグメントを選択した波長の光で照明して前記供与体及び受容体による蛍光を顕在化するステップと、

（ｆ）温度の関数として蛍光放射を測定して前記増幅した第１の選択セグメントから溶解する前記プローブの第１の溶解プロファイルと前記増幅した第２の選択セグメントから溶解する前記プローブの第２の溶解プロファイルとを決定するステップと、

（ｇ）前記第１の溶解プロファイルと前記第２の溶解プロファイルを比較し、識別可能な溶解プロファイルは前記サンプル・ゲノムＤＮＡのヘテロ接合性を表わすステップと、

を含むことを特徴とする。

（１）核酸、ただし前記核酸又はそのポリメラーゼ連鎖反応増幅した生成物が

２種類の異なった相補鎖から構成され、（２）前記核酸の選択したセグメントをポリメラーゼ連鎖反応によって増幅して増幅生成物を得るように構成された２種類のオリゴヌクレオチド・プライマー、（３）前記ポリメラーゼ連鎖反応を触媒するためのＤＮＡポリメラーゼを含むポリメラーゼ連鎖反応混合物においてポリ

メラーゼ連鎖反応の完了を決定する方法は、

（ａ）前記混合物に（１）蛍光共鳴エネルギー転移対の共鳴エネルギー転移供与体又は共鳴エネルギー転移受容体で標識され、選択された温度条件と単価イオン強度で前記増幅生成物にハイブリダイゼーションするように構成された有効量のオリゴヌクレオチド・プローブと、（２）前記供与体又は前記受容体で標識され、前記プローブと基準オリゴヌクレオチドの間で一方が前記供与体で標識され他方が前記受容体で標識され、前記基準オリゴヌクレオチドは前記選択された温度及び単価イオン強度の条件下で前記増幅生成物にハイブリダイゼーションするように構成されて前記プローブと前記基準オリゴヌクレオチドが両方とも前記増幅生成物にハイブリダイゼーションする場合前記供与体及び前記受容体が共鳴エネルギー転移関係にあるようにする有効量の基準オリゴヌクレオチドとを添加するステップと、

（ｂ）前記核酸の選択セグメントをポリメラーゼ連鎖反応によって増幅して前記増幅生成物を得るようにし、少なくともその一部分は共鳴エネルギー転移関係にある蛍光共鳴エネルギー転移対によりこれらにハイブリダイゼーションされた前記プローブと前記基準オリゴヌクレオチドの両方を有するようにするステップと、

（ｃ）選択した波長の光でハイブリダイゼーションされたプローブと基準オリゴヌクレオチドとを有する前記増幅生成物を照明して前記蛍光共鳴エネルギー対による蛍光を顕在化させ、蛍光放射をモニタして、前記蛍光放射が前記反応の完了を表わすプラトー・フェーズに達した時点でサイクルを決定するステップと、

を含むことを特徴とする。

（１）核酸、ただし前記核酸又はそのポリメラーゼ連鎖反応増幅した生成物は

２種類の異なった相補鎖から構成され、（２）前記核酸の選択したセグメントをポリメラーゼ連鎖反応によって増幅して増幅生成物を得るように構成された２種類のオリゴヌクレオチド・プライマー、（３）前記ポリメラーゼ連鎖反応を触媒するためのＤＮＡポリメラーゼを含むポリメラーゼ連鎖反応混合物におけるポリメラーゼ連鎖反応の完了を決定する方法は、

（ａ）前記混合物に有効量の核酸結合蛍光染料を添加するステップと、

（ｂ）前記核酸結合蛍光染料が添加された前記混合物でポリメラーゼ連鎖反応により前記選択した核酸セグメントを増幅して核酸結合蛍光染料が結合した前記増幅生成物を得るステップと、

（ｃ）核酸結合蛍光染料が結合している増幅生成物に選択した波長の光を照明してここからの蛍光を顕在化し、蛍光放射をモニタして、前記蛍光放射が前記反応の完了を表わすプラトー・フェーズに達した時点でサイクルを決定するステップと、

を含むことを特徴とする。望ましくは、核酸結合蛍光染料はＳＹＢＲ™グリーンＩ、臭化エチジウム、ピコグリーン、アクリジン・オレンジ、チアゾール・オレンジ、ＹＯ－ＰＲＯ－１、クロモマイシンＡ３から構成されるグループから選択した構成要素とし、さらに望ましくはＳＹＢＲ™グリーンＩとする。

二重鎖特異性蛍光染料を含むポリメラーゼ連鎖反応混合物のアニーリング、延長、変性フェーズの反復サイクルを含むポリメラーゼ連鎖反応の温度サイクル・パラメータを制御する方法であって、前記パラメータは前記アニーリング・フェーズの持続時間と、前記変性フェーズの持続時間と、サイクル数とを含み、

（ａ）選択した波長の光で前記反応を照明して前記蛍光染料からの蛍光を顕在化させ前記反復アニーリング、拡張、変性フェーズの間に蛍光を連続モニタするステップと、

（ｂ）少なくとも、

（ｉ）前記拡張フェーズの間に蛍光が増加を停止する持続時間、又は

（ｉｉ）前記変性フェーズの間に前記蛍光が基線レベルまで減少する持続時間、又は

（ｉｉｉ）前記拡張フェーズの間に前記蛍光が所定のレベルに達した回数

を決定するステップと、

（ｃ）前記拡張フェーズの間に蛍光が増加を停止する時間の長さに基づいた前記拡張フェーズの長さ、前記変性フェーズの間に蛍光が前記基線レベルまで減少した時間の長さに基づいた前記変性フェーズの長さ、又は前記拡張フェーズの間

に蛍光が前記所定レベルに達したサイクル数に基づくサイクル数を調節するステップと、

を含むことを特徴とする。

選択したポリメラーゼ連鎖反応混合物における増幅生成物の濃度を決定する方法は、

（ａ）前記増幅生成物の既知の濃度のハイブリダイゼーションのレートをモニタすることにより選択した温度と反応条件での前記増幅生成物での２次速度定数を決定するステップと、

（ｂ）前記増幅生成物の未知の濃度でのアニーリング速度を決定するステップと、

（ｃ）前記アニーリング速度と前記２次速度定数から前記増幅生成物の濃度を計算するステップと、

を含むことを特徴とする。望ましくは、アニーリング速度は多数の増幅サイクルの後で決定される。２次速度定数を決定する１つの代表的な方法は、既知の濃度の前記増幅生成物と有効量の二重鎖特異性蛍光染料とを含む第１のポリメラーゼ連鎖反応混合物の温度を、前記増幅生成物の変性温度以上に上昇して変性増幅生成物を得るステップと、

前記既知の量の変性増幅生成物を含む前記第１のポリメラーゼ連鎖反応混合物の温度を、前記増幅生成物の変性温度以下の選択した温度まで急冷すると同時に時間の関数として前記第１のポリメラーゼ連鎖反応混合物の蛍光を連続モニタするステップと、　極大蛍光、極小蛍光、極小蛍光の時間、及び増幅生成物の既知の濃度での２次速度定数を決定するため、式：

$$F = F_{max} - \frac{F_{max} - F_{min}}{k\ (t - t_0)\ [DNA] + 1}$$

ただしＦは蛍光、F_{max}は極大蛍光、F_{min}は極小蛍光、ｋは２次速度定数、t_0はF_{min}での時間、［ＤＮＡ］は前記増幅生成物の既知の濃度とするから時間の関数として蛍光をプロットするステップと、

を含むことを特徴とする。

競合的定量ポリメラーゼ連鎖反応による選択した核酸テンプレートの濃度を決定する方法は

（ａ）（ｉ）ポリメラーゼ連鎖反応において前記選択したテンプレートの選択したセグメントと相補的テンプレートのこれに対応する選択したセグメントを増幅してこれらの増幅生成物を得るように構成したオリゴヌクレオチド・プライマーの対の各々の有効量と、

（ｉｉ）蛍光共鳴エネルギー転移対の共鳴エネルギー転移供与体又は共鳴エネルギー転移受容体で標識された有効量のオリゴヌクレオチド・プローブであって、前記プローブが前記競合的テンプレートの増幅生成物から溶解する溶解温度から識別可能な溶解温度での前記選択したテンプレートの増幅生成物から溶解するように前記増幅生成物にハイブリダイゼーションするように構成されている前記プローブと、

（ｉｉｉ）前記プローブと転移オリゴヌクレオチドの間で一方が前記供与体により標識され他方が前記受容体により標識されているとして、前記供与体又は前記受容体で標識された有効量の基準オリゴヌクレオチドであって、前記基準オリゴヌクレオチドは前記プローブと前記基準オリゴヌクレオチドの両方が前記増幅生成物にハイブリダイゼーションする場合に前記供与体と前記受容体が共鳴エネルギー転移関係になるように前記増幅生成物にハイブリダイゼーションするよう構成されたオリゴヌクレオチドと、

を含む反応混合物において、ポリメラーゼ連鎖反応により、未知の量の選択したテンプレートと既知の量の前記競合的テンプレートを増幅して前記増幅生成物を得るステップと、

（ｂ）前記反応混合物を選択した波長の光で照明して蛍光共鳴エネルギー転移対による蛍光を顕在化させ、反応混合物の温度が変化して前記選択したテンプレートの前記増幅生成物から溶解する前記プローブの第１の溶解曲線と前記競合的テンプレートから溶解する前記プローブの第２の溶解曲線とを得る場合に温度の関数として蛍光放射を決定するステップと、

（ｃ）前記第１と第２の溶解曲線から第１と第２の溶解溶解ピークに変換して

当該溶解ピークから前記選択したテンプレートと前記競合的テンプレートの相対量を決定するステップと、

（ｄ）前記既知の量の前記競合的テンプレートと、前記選択したテンプレート及び競合的テンプレートの相対量とに基づいて前記選択したテンプレートの濃度を計算するステップと、

を含むことを特徴とする。

蛍光共鳴エネルギー転移対はフルオレセインとＣｙ５、又はＣｙ５．５からなる。

ポリメラーゼ連鎖反応において選択した核酸テンプレートの濃度を決定する方法は、

（ａ）（ｉ）ポリメラーゼ連鎖反応において前記選択したテンプレートの選択した第１のセグメントを増幅して増幅した第１の生成物を得るように構成された第１の対のオリゴヌクレオチド・プライマーの各々の有効量と、

（ｉｉ）ポリメラーゼ連鎖反応において基準テンプレートの選択した第２のセグメントを増幅して増幅した第２の生成物を得るように構成された第２の対のオリゴヌクレオチド・プライマーの各々の有効量と、

（ｉｉｉ）核酸結合蛍光染料の有効量と、

を含む反応混合物において、

ポリメラーゼ連鎖反応により、未知の量の前記選択したテンプレートを増幅して前記増幅した第１の生成物を得る及び既知の量の前記基準テンプレートを増幅して前記増幅した第２の生成物を得るステップと、

（ｂ）選択した波長の光で前記反応混合物を照明して核酸結合蛍光染料による蛍光を顕在化させ、温度の関数として放射された蛍光を連続的にモニタして第１の生成物と第２の生成物が異なる温度で溶解するような前記増幅生成物の溶解曲線を得るステップと、

（ｃ）前記溶解曲線を溶解溶解ピークに変換して当該溶解ピークから前記選択したテンプレートと前記基準テンプレートの相対量を決定するステップと、

（ｄ）前記既知の量の前記基準テンプレートと選択したテンプレート及び基準

テンプレートの相対量とに基づいて前記選択したテンプレートの濃度を計算するステップと、

を含むことを特徴とする。

陽性対照テンプレートも含むポリメラーゼ連鎖反応において選択したテンプレートの増幅をモニタする方法は、

（ａ）（ｉ）ポリメラーゼ連鎖反応において前記選択したテンプレートの選択した第１のセグメントを増幅して増幅された第１の生成物を得るように構成されたオリゴヌクレオチド・プライマーの第１の対の各々の有効量と、

（ｉｉ）ポリメラーゼ連鎖反応において、陽性対照テンプレートの選択された第２のセグメントを増幅して増幅された第２の生成物を得るように構成されたオリゴヌクレオチド・プライマーの第２の対の各々の有効量と、

（ｉｉｉ）有効量の核酸結合蛍光染料と、

を含む反応混合物において、

前記選択したテンプレートと前記陽性対照テンプレートをポリメラーゼ連鎖反応によって増幅するための条件に前記選択したテンプレートと前記陽性対照テンプレートをさらすステップと、

（ｂ）前記反応混合物を選択した波長の光で照明して核酸結合蛍光染料による蛍光を顕在化し、前記ポリメラーゼ連鎖反応の増幅サイクル中に温度の関数として放射される蛍光を連続的にモニタして前記選択したテンプレートが増幅される場合前記増幅された第１の生成物の第１の溶解ピークを、また前記陽性対照テンプレートが増幅される場合前記増幅された第２の生成物の第２の溶解ピークを取得するステップとを含み、

前記第２の溶解曲線の取得はポリメラーゼ連鎖反応が作用したことを表わし、前記第１の溶解曲線の取得は前記選択した第１のセグメントが増幅可能であることを表わし、前記第１の溶解曲線が欠如していることは前記選択した第１のセグメントが増幅不可能であることを表わすことを特徴とする。

個人の第Ｖ因子ライデン変異を検出する方法であって、第Ｖ因子ライデン変異は野生型と比較して第Ｖ因子ライデン変異配座での単一塩基変化で構成され、

（ａ）前記個人からサンプル・ゲノムＤＮＡを採得するステップと、

（ｂ）対照として野生型ゲノムＤＮＡを提供するステップと、

（ｃ）前記サンプル・ゲノムＤＮＡと前記野生型ゲノムＤＮＡの選択したセグメントをポリメラーゼ連鎖反応によって増幅するように構成されたオリゴヌクレオチド・プライマーの対を提供し、前記選択したセグメントは第Ｖ因子ライデン変異配座を含み、第Ｖ因子ライデン変異配座のコピーを含む増幅生成物を得るステップと、

（ｄ）蛍光共鳴エネルギー転移対の共鳴エネルギー転移供与体又は共鳴エネルギー転移受容体で標識されたオリゴヌクレオチド・プローブを提供し、前記プローブは前記増幅された生成物にハイブリダイゼーションするように構成されて前記プローブが前記変異配座にまたがり前記サンプル・ゲノムＤＮＡに前記野生型ゲノムＤＮＡの溶解プロファイルから区別できる第Ｖ因子ライデン変異が存在する場合溶解プロファイルを示すステップと、

（ｅ）共鳴エネルギー転移供与体又は共鳴エネルギー転移受容体で標識された転移オリゴヌクレオチドを提供し、前記プローブと転移オリゴヌクレオチドの間で一方が共鳴エネルギー転移供与体で標識され他方が共鳴エネルギー転移受容体で標識されているとして、前記転移オリゴヌクレオチドは前記増幅生成物にハイブリダイゼーションするように構成して前記プローブと前記転移オリゴヌクレオチドの両方が前記増幅生成物にハイブリダイゼーションする場合に共鳴エネルギー転移供与体と共鳴エネルギー転移受容体が共鳴エネルギー転移関係にあるようにするステップと、

（ｆ）有効量のオリゴヌクレオチド・プローブと転移オリゴヌクレオチドの存在下でサンプル・ゲノムＤＮＡと野生型ゲノムＤＮＡの前記選択したセグメントをポリメラーゼ連鎖反応により増幅して、増幅された選択セグメントを得るようにし、少なくともその一部分は共鳴エネルギー転移関係にある蛍光共鳴エネルギー転移対によりこれらにハイブリダイゼーションされた前記プローブと前記転移オリゴヌクレオチドの両方を有するようにするステップと、

（ｇ）前記ポリメラーゼ連鎖反応の増幅サイクルの間の温度の関数として蛍光

を測定してサンプル・ゲノムＤＮＡの前記増幅セグメントから溶解する前記プローブの溶解プロファイルと前記野生型ゲノムＤＮＡの増幅セグメントから溶解する前記プローブの溶解プロファイルとを取得するステップと、

（ｈ）前記サンプル・ゲノムＤＮＡについての前記溶解プロファイルを前記野生型ゲノムＤＮＡについての前記溶解プロファイルと比較し、これらの差が前記サンプル・ゲノムＤＮＡにおける第Ｖ因子ライデン変異の存在を表わすステップと、

を含むことを特徴とする。

核酸ハイブリダイゼーションを分析するための方法は

（ａ）分析すべき核酸サンプルと核酸結合蛍光体とを含む混合物を提供するステップと、

（ｂ）温度を≧毎秒０．１℃の速度で変化させながら蛍光をモニタするステップと、

を含むことを特徴とする。

未知の量の核酸を含むサンプルの初期コピー数を定量する方法は、

（ａ）ポリメラーゼ連鎖反応により既知の濃度の少なくとも一つの標準を、前記標準と核酸結合蛍光体とを含む混合物中で増幅するステップと、

（ｂ）サイクル数の関数として蛍光を測定して一組のデータ点を得るステップと、

（ｃ）初期核酸濃度とサイクル数の関数として蛍光を記述する任意の所定の式

に前記データ点を当てはめるステップと、

（ｄ）前記サンプルと前記核酸結合蛍光体とを含む混合物中で未知の量の核酸を含む前記サンプルを増幅してこれの蛍光をモニタするステップと、

（ｅ）ステップ（ｃ）で求めた式から初期核酸濃度を決定するステップと、

を含むことを特徴とする。

蛍光共鳴エネルギー転移対が開示され、前記対は放射スペクトルを有する供与体蛍光物質と、吸収スペクトルを有し消光係数が１００，０００$M^{-1}cm^{-1}$より大きい受容体蛍光物質とを含む含み、前記供与体蛍光物質の放射スペクトルと前

記受容体蛍光物質の吸収スペクトルは２５％未満でオーバラップする。本明細書で説明される１つの代表的な蛍光共鳴エネルギー転移対は供与体蛍光物質がフルオレセインであり受容体蛍光物質がＣｙ５又はＣｙ５．５である。

生物学的サンプルの標的ＤＮＡ配列を分析するための方法は、核酸結合蛍光体の存在下でポリメラーゼ連鎖反応により前記標的配列を増幅し、前記ポリメラーゼ連鎖反応には前記標的とされる核酸配列に対する熱安定性ポリメラーゼ及びプライマーを前記生物学的サンプルに添加して少なくとも変性温度と伸長温度の間で前記生物学的サンプルを熱サイクルするステップを含むステップと、

前記核酸結合蛍光体により吸収される波長の光によって前記サンプルを励起するステップと、

前記サンプルの温度が変化する際に前記核酸結合蛍光体からの温度依存性蛍光をモニタするステップとを含むことを特徴とする。望ましくは、核酸結合蛍光体には二重鎖核酸結合蛍光染料たとえばＳＹＢＲ™グリーンＩ等を含む。温度依存性蛍光は、望ましくは溶解曲線分析によって、増幅生成物を識別するために使用できる。２種類又は３種類以上の増幅生成物の相対量を溶解曲線の分析で求めることができる。たとえば、溶解曲線より下の領域は多重ガウス分布の和の非線形最小自乗法回帰で見付けられる。

図面の簡単な説明

図１Ａ及び図１Ｂは平衡ＰＣＲパラダイム（Ａ）と動的ＰＣＲパラダイム（Ｂ）

を表わすグラフである。

図２は蛍光ハイブリダイゼーションモニタリングに有用な温度対時間セグメントを表わす。

図３はＰＣＲの高速温度サイクルで代表的な温度対時間のチャートである。

図４は４種類の異なる温度／時間プロファイル（Ａ～Ｄ）の結果と、これらから得られた３０サイクル後の増幅生成物である。

図５Ａ、図５Ｂ、図５ＣはＰＣＲの蛍光をモニタする３種類の異なる方法での蛍光生成メカニズムを示し、（Ａ）二重鎖ＤＮＡ染料、（Ｂ）水解プローブ、（

Ｃ）ハイブリダイゼーション・プローブである。

図６はＣｙ５™の一価Ｎ－ハイドロキシサクシニミド・エステルの化学構造を表わす。

図７はＣｙ５．５™の一価Ｎ－ハイドロキシサクシニミド・エステルの化学構造を表わす。

図８はフルオレセイン（実線）の放射スペクトルとＣｙ５（破線）の励起スペクトルを表わす。

図９はＰＣＲ中の各サイクルでフルオレセインとＣｙ５で標識した隣接するハイブリダイゼーション・プローブの間に発生する共鳴エネルギー転移を示す。

図１０はＰＣＲ中に生成される共鳴エネルギー転移信号においてＣｙ５プローブとフルオレセイン・プローブの比を変化させる効果を示す。

図１１はＰＣＲ中に生成される共鳴エネルギー転移信号において任意のプローブ比でのプローブ濃度を変化させる効果を示す。

図１２はＰＣＲ中に生成される共鳴エネルギー転移信号において標識オリゴヌクレオチドの間の間隔の効果を示す。

図１３はＴａｑＤＮＡポリメラーゼ（ｅｘｏ$^{+}$；実線）とＴａｑＤＮＡポリメラーゼのＳｔｏｆｆｅｌ分画（ｅｘｏ$^{-}$；点線）を用いた増幅３０サイクル直後の、隣接するハイブリダイゼーション・プローブによるＰＣＲ中の蛍光発生に対する温度サイクルおよびポリメラーゼの種類の蛍光エネルギー転移による隣接プローブ・ハイブリダイゼーションの時間経過を示す。温度は太線で図示されている。

図１４はＴａｑＤＮＡポリメラーゼ（ｅｘｏ$^{+}$；実線）と、ＴａｑＤＮＡポリメラーゼのＳｔｏｆｆｅｌ分画（ｅｘｏ$^{-}$；破線）とＫｌｅｎＴａｑＤＮＡポリメラーゼ（ｅｘｏ$^{-}$；点線）による増幅での蛍光比対サイクル数のプロットである：上部パネル―サイクルは９４℃と６０℃の間で２０秒間６０℃で保持、中央パネル―サイクルは９４℃と６０℃の間で１２０秒間６０℃で保持、下部パネル―サイクルは９４℃と６０℃の間で６０℃から７５℃までゆっくりと温度上昇。

図１５はＳｙｂｒ™グリーンＩを用いてモニタした多数の異なる初期テンプレ

ート・コピー反応での蛍光体サイクル数のプロットである：０，（△）；１，（■）；１０，（－）１０^{2}，（－）；１０^{3}，（＋）；10^{4}，（●）、10^{5}，（◇）；10^{6}，（×）；10^{7}，（▲）；10^{8}，（□）；10^{9}，（◆）。

図１６は２重標識水解プローブを用いてモニタした多数の異なる初期テンプレート・コピー反応での蛍光比対サイクル数のプロットである：０，（－）；１，（▲）；１０，（○）；10^{2}，（*）；10^{3}，（●）；10^{4}，（□）；10^{5}，（＋）；10^{6}，（■）；10^{7}，（◇）；10^{8}，（×）；10^{9}，（◆）。

図１７は隣接ハイブリダイゼーション・プローブでモニタした多数の異なる初期テンプレート・コピー反応での蛍光比対サイクル数のプロットである：０，（—）；１，（▲）；１０，（○）；10^{2}，（*）；10^{3}，（●）；10^{4}，（□）；10^{5}，（＋）；10^{6}，（■）；10^{7}，（◇）；10^{8}，（×）；10^{9}，（◆）。

図１８は共鳴エネルギー転移によりモニタされる２種類のハイブリダイゼーション・プローブ設計を区別する蛍光比対サイクル数のプロットである：（◇）は各々フルオレセインとＣｙ５で標識した２種類のハイブリダイゼーション・プローブ；（◆）はＣｙ５で標識したプライマーとフルオレセインで標識したプローブである。

図１９Ａから図１９Ｃは、ＰＣＲでの３種類の蛍光モニタリング技術の比較を提供し、二重鎖特異性ＤＮＡ染料^{S}ＹＢＲグリーンＩ（Ａ）、２重標識フルオレセイン／ローダミン水解プローブ（Ｂ）、Ｃｙ５標識プライマーとフルオレセイン標識ハイブリダイゼーション・プローブ（Ｃ）を含む；図１９Ｄは図１９Ａから図１９Ｃまでに表わされている３種類のモニタリング技術の変動係数を示す。

図２０はＳＹＢＲグリーンＩでモニタされる標準増幅の代表的対数蛍光対サイクル数のプロットを示す。

図２１は図２０のデータのサイクル２０～２７に適合させた双曲線を示す。

図２２は増幅データから初期コピー数を決定するため未知サンプルに適合させた双曲線を表わす。

図２３は各サイクル隣接ハイブリダイゼーション・プローブでモニタされる５種類の標準の代表的な蛍光対サイクル数のプロットで、初期コピー数は次のよう

に表わしてある：10^3，（●）；10^4，（◇）；10^5，（▲）；10^6，（□）；10^7，（◆）。

図２４は図２３の標準データに適合させた曲線を示す。

図２５は各サイクル水解プローブでモニタされる５種類の標準の代表的な蛍光対サイクル数のプロットを示し、初期コピー数は次のように表わしてある：１．５，（●）；１５，（◇）；１５０，（▲）；１５００，（□）；１５，０００，（◆）。

図２６は図２５の標準データに適合させた曲線を示す。

図２７はＳＹＢＲグリーンＩでモニタされる３種類の標準増幅の代表的対数蛍光対サイクル数のプロットを示し、ここでは（■）；（●）；（▲）である。

図２８は図２７の標準データに適合させた異なる曲線を示す。

図２９Ａ及び図２９Ｂは時間対蛍光（Ａ）と時間対温度（Ｂ）のプロットで温度と蛍光の間の逆比例関係を明示している。

図３０は温度対時間、蛍光対時間、蛍光対温度の２Ｄプロットを示すチャートでＳＹＢＲグリーンＩの存在下におけるhepatitis B（Ｂ型肝炎）ゲノムの１８０塩基対フラグメントの増幅について３Ｄプロットとしても図示してある。

図３１はＳＹＢＲグリーンＩの存在下でヒトβグロブリン遺伝子の５３６塩基対フラグメントの増幅についての蛍光対温度投影図である。

図３２Ａ及び図３２Ｂは水解プローブについての温度による蛍光比の直線性変化(Ａ)とハイブリダイゼーション・プローブでの温度によるラジカルな変化(Ｂ)とを示すプロットを提供する。

図３３は隣接ハイブリダイゼーション・プローブの存在下にｅｘｏ⁻ポリメラーゼによる増幅の蛍光比対温度プロットを示す。

図３４は隣接ハイブリダイゼーション・プローブの存在下でｅｘｏ⁺ポリメラーゼによる増幅の蛍光比対温度プロットを示す。

図３５は隣接ハイブリダイゼーション・プローブの存在下にｅｘｏ⁻ポリメラーゼによる増幅中の温度、時間、蛍光の三次元プロットを示す。

図３６は隣接ハイブリダイゼーション・プローブの存在下にｅｘｏ⁺ポリメラ

ーゼによる増幅中の温度、時間、蛍光の三次元プロットを示す。

図３７はhepatitis B（Ｂ型肝炎）ウィルス（●；５０％ＧＣ、１８０ｂｐ）、βグロブリン（▲；５３．２％ＧＣ、５３６ｂｐ）、前立腺特異抗原（×；６０．３％ＧＣ、２９２ｂｐ）のＰＣＲ増幅生成物での溶解曲線を示す。

図３８は０．１℃から５．０℃の加熱レートにおけるhepatitis B（Ｂ型肝炎）ウィルスのＰＣＲ増幅生成物の溶解曲線を示す。

図３９はＳＹＢＲ™グリーンＩの各種濃度におけるhepatitis B（Ｂ型肝炎）ウィルスのＰＣＲ増幅生成物の溶解曲線を示す。

図４０Ａ及び図４０Ｂは（ａ）追加テンプレートなし、（ｂ）低厳密度条件下で１０の６乗コピーの追加テンプレート、（ｃ）高厳密度条件下での１０の６乗コピーの追加テンプレートで増幅したβグロブリン分画生成物についての、（Ａ）溶解曲線と、（Ｂ）電気泳動分画バンドを示す。

図４１Ａ及び図４１Ｂはhepatitis Bウィルス分画（ＨＢＶ）、βグロブリン、及びこれらの混合物の（Ａ）溶解曲線と、（Ｂ）溶解ピークを示す。

図４２Ａから図４２Ｄは（Ａ）様々な量のβグロブリン・テンプレートからＰＣＲ増幅した生成物についての相対蛍光対サイクル数のプロット、各種生成物の（Ｂ）溶解ピークと（Ｃ）電気泳動バンド、（Ｄ）（Ａ）のデータの補正蛍光を示す。

図４３Ａ及び図４３Ｂは嚢胞性線維症遺伝子及びｃ－ｅｒｂＢ－２オンコジーンの混合物のＰＣＲ増幅生成物からの（Ａ）溶解曲線と、（Ｂ）溶解ピークを示す。

図４４は嚢胞性線維症遺伝子（ＣＦＴＲ）とｃ－ｅｒｂＢ－２（ｎｅｕ）について様々なサイクル数での溶解ピークを示す。

図４５はＣＦＴＲとｎｅｕＰＣＴ生成物の積分溶解ピークのグラフである。

図４６Ａ及び図４６Ｂは第Ｖ因子ライデン変異ヘテロ接合性のヒト（実線）、第Ｖ因子ライデン変異ホモ接合性のヒト（点線）、野生型ホモ接合性（破線）、ＤＮＡ対照なし（一点鎖線）のＰＣＲ生成物についての（Ａ）溶解曲線と、（Ｂ）溶解ピークを示す。

図４７は第Ｖ因子ライデン変異ホモ接合性サンプル（実線）、第Ｖ因子ライデン変異ヘテロ接合性（点線）、野生型ホモ接合性（一点鎖線）のＰＣＲ生成物の４０サイクル中の連続モニタの蛍光比対温度のプロットを示す。

図４８はメチレンテトラヒドロ葉酸遺伝子のホモ接合型突然変異（実線）、野生型ホモ接合性（破線）、ヘテロ接合突然変異（点線）、ＤＮＡ対照なし（一点鎖線）の溶解ピークを示す。

図４９は各種の初期テンプレート量から増幅したβグロブリンＰＣＲ生成物のアニーリング曲線の形状を示す。

図５０は初期テンプレート濃度を決定するための２次速度定数の決定を示す。

図５１は蛍光データから熱サイクルを制御するためのブロック図である。

図５２Ａ及び図５２Ｂは（Ａ）２０サイクル後に取得した温度対時間のプロットと、（Ｂ）２５サイクル後に取得した蛍光対時間のプロットを示し、熱サイクルは蛍光データから制御した。

詳細な説明

ＰＣＲ中のハイブリダイゼーションをモニタする本発明の方法を開示し説明する前に、本発明は本明細書で開示される特定の構成、処理ステップ、材料に制限されるものではなく、こうした構成、処理ステップ、材料は何らか変化することがあることを理解されるべきである。また本発明の範囲は付録の請求項及びその等価物によってのみ制限されるものであるから本明細書で用いられている術語は特定の実施例を説明する目的でのみ用いられていることも理解されて然るべきである。

本明細書及び付録の請求項で用いられているように、単数形表現“a” “a_n” “the”はコンテクストでとくに何らか明言していない限り複数対象も含むことには注意すべきである。

本発明の説明と請求において、以下の術語は以下に明示した定義にしたがって用いられる。

本明細書で用いている「核酸」「ＤＮＡ」及び類似の術語も核酸アナログ、即ちリン酸ジエステル骨格以外を有する類似物も含む。たとえば、いわゆる「ペプ

チド核酸」は従来技術で公知となっているが骨格においてリン酸ジエステル結合の代わりにペプチド結合を有しており、本発明の範囲内に含まれるものと解釈される。

本明細書で用いている「連続モニタリング」及び類似の術語はＰＣＲのサイクルの間の多数の時刻でモニタし、望ましくは温度遷移中、又さらに望ましくは各温度遷移において少なくとも一つのデータ点を取得することを表わす。

本明細書で用いている「サイクル毎」モニタリングは各サイクル毎に１回、望ましくはＰＣＲのアニーリング相の間に、ＰＣＲ反応をモニタすることを意味する。

本明細書で用いている「蛍光共鳴エネルギー転移関係」及び類似の術語は、供与体蛍光物質が共鳴エネルギーを受容体蛍光物質に転移して受容体蛍光物質が測定可能な蛍光放射を発生することができるようにするように、供与体蛍光物質で標識されたオリゴヌクレオチドと受容体蛍光物質で標識されたオリゴヌクレオチドとの核酸に対する隣接ハイブリダイゼーションを表わす。供与体蛍光物質と受容体蛍光物質があまり遠すぎる距離に離れていると、受容体蛍光物質が測定可能な蛍光を放射できるように受容体蛍光物質へ共鳴エネルギーを転移することができず、したがって供与体蛍光物質と受容体蛍光物質は共鳴エネルギー転移関係にはない。望ましくは、２種類の標識されたオリゴヌクレオチドが両方ともプローブであり、どちらもＰＣＲプライマーとして機能しない場合、（「プローブープローブ」）供与体蛍光物質と受容体蛍光物質はおよそ０～２５ヌクレオチド以内であり、さらに望ましくは０～５ヌクレオチド以内、また最も望ましいのは０～２ヌクレオチド以内である。特に好適な間隔は１ヌクレオチドである。標識オリゴヌクレオチドの一方がＰＣＲプライマーとしても機能する（「プローブープライマー」）場合、供与体蛍光物質と受容体蛍光物質はおよそ０～１５ヌクレオチド以内が望ましく、およそ４～６ヌクレオチド以内がさらに望ましい。

本明細書で用いている「有効量」は選択した効果を発生するのに充分な量を表わす。たとえば、ＰＣＲプライマーの有効量は、ＤＮＡポリメラーゼ、バッファ、テンプレート及び温度条件を含めてＰＣＲを実施するのに必要であることが従

来技術で知られているその他の条件も提供されている場合にＰＣＲによって核酸のセグメントを増幅するのに充分な量である。

ＰＣＲは反復的テンプレート変性とプライマーのアニーリングを必要とする。これらのハイブリダイゼーション遷移は温度依存である。増幅を進めるＰＣＲの温度サイクルは、高温で生成物の変性蓄積と低温での生成物へのプライマー付着（アニーリング）を交互に行なう。生成物の変性とプライマー・アニーリングの遷移温度播種としてＧＣ成分と長さに依存する。プローブがＰＣＲ生成物に中間部でハイブリダイゼーションするように設計されている場合、プローブの溶解温度もまたＧＣ成分、長さ、及び標的に対する相補性の度合に依存する。ＰＣＲで互換性のある蛍光プローブは増幅中のハイブリダイゼーションをモニタできる。

高速サイクルとの関連で使用されるのが望ましい（１９９６年６月４日付でＰＣＲ処理をモニタするためのシステム及びその方法と題する前述の米国特許出願番号第０８／６５８，９９３号、及び１９９５年１０月２日付で生物学的サンプルの高速熱サイクルのための方法と題する米国特許出願番号第０８／５３７，６１２号に完全に説明されている）本発明によれば、ＰＣＲの動態パラダイムが適切である。ＰＣＲについて３種類の反応（変性、アニーリング、拡張）が３つの時間間隔の間に３つの異なる温度で起こると考えるのではなく（図１Ａ）、ＰＣＲの動的パラダイムがもっと有用である（図１Ｂ）。動態パラダイムでは、温度

対時間曲線はオーバラップする反応の間の連続遷移から構成される。変性とアニーリングは非常に高速で特定温度での保持時間は必要としない。拡張は変化する速度である温度範囲にわたって起こる。完全な分析には全ての温度にわたる全部の関連速度定数についての知識が必要であろう。全反応の速度定数が分かっていれば、「ＰＣＲの物理化学的説明」が発達する。これらの速度を決定するには正確な温度制御が必要であり温度サイクル中の反応モニタリングによって大幅に簡略化される。

図２は蛍光ハイブリダイゼーション・モニタリングでの有用な温度対時間セグメントを示している。生成物溶解曲線はゆっくりと変性へ向かう温度上昇中に得られる。変性後に一定温度へ温度を急激に下げることによって、生成物、プロー

ブ、又はプライマーのアニーリングがオプションとして後続できる。プローブ溶解曲線はプローブＴｍ付近の温度を通ってゆっくりと過熱すると得られる。図２に図示してある実施例は温度サイクル中の全分析をすぐリアルタイムの表示で提供する。蛍光プローブは温度サイクル中のプライマー、プローブ、又は生成物ハイブリダイゼーションの連続モニタリングのために増幅溶液の一部分として含めてある。

本発明に含まれる蛍光ハイブリダイゼーション技術は高速サイクルに基づくもので、速度と特異性を利点とする。

高速サイクルＰＣＲ中のサンプル温度プロファイルを図３に図示してある。変性とアニーリングは、従来のＰＣＲの温度サイクルたとえば図１Ａでの広い平坦域とは対向して、これらの図面では温度「スパイク」として現われている。高速温度サイクルは図４の従来の温度サイクルと対照され、３０サイクルの増幅が１５分で完了し得られたＰＣＲ生成物はかなり少ない副生成物しか含まないことが示されている。つまり、高速サイクルによると必要とされる増幅時間はおよそ１０分の１に減少し、特異性が向上する。

実施例１

図４は４種類の異なる温度／時間プロファイル（Ａ～Ｄ）の結果と３０サイクル後にそれらで得られた増幅生成物（Ａ～Ｄ）を示す。図４のプロファイルＡとＢは従来技術の微量遠沈管を使用する従来技術の過熱ブロック装置を用いて得られた。図４から分かるように、温度間の遷移はゆっくりでプロファイルＡとＢには多数の非特異性バンドが存在する。プロファイルＢは各々のサンプルが各々の温度に留まる時間を制限することによって非特異性バンド（プロファイルＡとは対照的に）の幾つかを排除する点で改善を示している、つまり短時間ではさらに望ましい結果が発生することを表わしている。

プロファイルＣとＤは高速温度サイクラを使用して得られた。図４から分かるように、増幅は特異的であり、収量は６０秒の拡張時間（Ｃ）で最大となるが、１０秒の拡張時間（Ｄ）でも全体として充分である。

ヒトゲノムＤＮＡ由来のβグロブリン５３６ｂｐフラグメントの増幅に最適な

時間と温度も決定された。増幅収量と生成物の特異性は変性（９３℃）とアニーリング（５５℃）が１秒未満の場合に最適だった。変性又はアニーリング時間が長くても何らの利点は見られなかった。収量は７７℃で長い拡張時間だと増加したが、１０～２０秒より長い拡張時間ではほとんど変化が見られなかった。このように予想しなかった結果は、ＤＮＡ増幅のために用いられる従来利用可能な装置が物理的酵素的な反応条件を最適化するのに必要とされる条件を最大にしていないことを表わしている。

さらに詳しい情報は、Ｃ．Ｔ．ウィットワーら、嚢胞性線維症デルタＦ（５０８）配位での高速サイクル対立遺伝子特異性増幅、(C. T. Wittwer et al.,Rapid Cycle Allele-Specific Amplification with Cystic Fibrosis deltaF(508)Locus, 39, Clinical Chemistry 804(1993))及びＣ．Ｔ．ウィットワーら、高速ＤＮＡ増幅、(C. T. Wittwer et al., Rapid DNA Amplification, The Polymerase Chain Reaction 174(1994)に解説されており、これらはどちらも本明細書で参照に含まれる。蛍光観察と高速温度サイクルに用いられる機材は前述の米国特許出願第０８／５３７，６１２号に完全に開示されている。

先に述べたように、ポリメラーゼ連鎖反応は高速で実行できる。急速熱伝導を容易にすることに加えて光学的に透明な毛細管を使用すると本発明によるＤＮＡ増幅の連続的蛍光モニタリングが可能になる。

蛍光プローブはＤＮＡ増幅を検出しモニタするために使用できる。有用なプローブとしては、二重鎖ＤＮＡ特異性染料や配列特異性プローブが挙げられる。ＤＮＡ増幅を追跡するための３種類の異なる蛍光技術を図５で比較している。図５Ａでは、蛍光は二重鎖特異性ＤＮＡ染料で検出されるＰＣＲ生成物のハイブリダイゼーションに依存している。図５Ｂにおいて、蛍光は５’－エクソヌクレアーゼ消光プローブの水解に依存しており、これは前述のように従来技術で周知となっている。図５Ｃでは２つの隣接プローブにおける蛍光物質間の共鳴エネルギー転移に基づいたハイブリダイゼーション方式を図示している。図５Ａの方法は配列特異性ではないが、生成物の特異性は溶解曲線によって決定でき、これは本発

明の１つの側面である。図５Ｂ及び図５Ｃは両方とも配列特異性である。しかし該ハイブリダイゼーション法は溶解曲線による分析を可能にし、これは本発明の別の側面である。

図５Ｂに図示したように水解プローブが関係する反応からと図５Ｃに図示したようにハイブリダイゼーション・プローブが関係する反応からの蛍光をモニタする際、供与体蛍光物質と受容体蛍光物質両方から放射される蛍光を測定するのが有利である。具体的には、水解プローブによって放射される蛍光の大半は供与体蛍光物質からのもので、ハイブリダイゼーション・プローブによって放射される蛍光の大半は受容体蛍光物質からのものである。

二重鎖特異性ＤＮＡ染料の選択。蛍光技術に臭化エチジウムを用いるのが当業者には馴染み深いであろう。二重鎖特異性蛍光染料が増幅中に存在する場合、二重鎖生成物が多く作られる程蛍光は一般に増加する。Ｒ．ヒグチら、特定ＤＮＡ配列の同時増幅と検出、（R. higuchi et al., Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences, 10 Bio/Technology 413–417(1992)）参照。インターカレータＹＯ－ＰＲＯ－１を用いたhepatitis C（Ｃ型肝炎）ＲＮＡの蛍光ＰＣＲアッセイも従来技術で公知である。Ｔ．イシグロら、蛍光インターカレータ存在下のポリメラーゼ連鎖反応によるhepatitis Cウィルスの均質定量アッセイ（T. Ishiguro et al., Homogenenous quantitative assay of hepatitis C virus RNA by polymerase chain reaction in the presence of a fluorescent intercalater, 229 Anal. Biochem. 207 - 213(1995)）参照。従来技術で公知であり、米国オレゴン州ユージーンにあるモレキュラー・プローブズ社（Molecular Probes of Eugene, Oregon）から入手できるＳＹＢＲ™グリーンＩを二重鎖特異性染料として使用するのが好適である。この染料の分子構造は企業秘密であるが、ゲル上でのＤＮＡ検出用にさらに高感度の二重鎖特異性染料としてメーカーから推奨されている。ＳＹＢＲ™グリーンＩは熱安定性が悪いが、しかしそのために長い時間間隔にわたって反応混合物の温度が溶解温度に維持されるような従来方によるポリメラーゼ連鎖反応の蛍光モニタリングには有用ではない。この熱不安定性のため、溶解温度が長時間にわたって維持されない場合、

即ちＰＣＲが前述した動態パラダイムにしたがって高速サイクルにより行なわれる場合に、ＳＹＢＲ™グリーンＩがＰＣＲ反応をモニタするために使用できることが発見されたのは予想外だった。

実施例２

１０，０００テンプレートコピーからのヒトβグロブリン遺伝子のＰＣＯ３／ＰＣＯ４プライマー対からの１１０塩基対分画の増幅をモニタすることにより異なった二重鎖特異性ＤＮＡ染料を比較した。プライマーは従来技術で公知の通りに標準的ホスホラミダイト化学によって、即ちファルマシア・バイオテック遺伝子アセンブラ・プラス（Pharmacia Biotech Gene Assembler Plus）（ニュージャージー州ピスカタウェイ）を使用して合成された。ヒトβグロブリン・プライマーＰＣ０３／ＰＣ０４（１１０塩基対）はＣ．Ｔ．ウィットワーら、熱気による毛細管内自動ポリメラーゼ連鎖反応(C. T. Wittwer et al., Automated polymerase chain reaction in capillary tubes with hot air, 17 Nucl. Acids. Res. 4353 - 4357(1989))に説明されており、本明細書で参照に含まれる。ＤＮＡ増幅は、以下の実施例で特に記載していない限り、５０ｍＭトリス、ｐＨ８．

５（２５℃），３ｍＭＭｇＣｌ$_2$，５００μｇ／ｍｌウシ血清アルブミン、０．５μＭの各プライマー、０．２ｍＭの各デオキシヌクレオシド三リン酸、５μｌサンプルあたり０．２単位のＴａｑポリメラーゼで行なった。精製した増幅生成物をＤＮＡテンプレートとして使用し、フェノール／クロロホルム抽出とエタノール沈殿法で得られた。Ｄ．Ｍ．ウォーレス、核酸の大規模及び小規模フェノール抽出及び沈殿法（D. M. Wallace, Large-and Small-scale phenol extractions apd precipitation of nucleic acids, 152 Methods in Enzymology 33-48(1987)）参照。これに続けてセントリコン３０マイクロコンセントレータによる反復洗浄でプライマーの除去を行なった（アミコン社、マサチューセッツ州ダンバース）。テンプレート濃度は２６０ナノメートルの吸光度で求めた。テンプレートのＡ（２６０）：Ａ（２８０）比は１．７以上だった。

ＳＹＢＲ™グリーンＩ（モレキュラー・プローブズ社、オレゴン州ユージーン）を１：１０，０００倍希釈、臭化エチジウムは５μｇ／ｍｌ、アクリジン・オ

レンジは３μｇ／ｍｌで用いた。これらの濃度は各々の染料で増幅中に観察される蛍光信号が最大になる最適濃度となるように決定した。励起はキセノン・アーク光源から４５０～４９０ナノメートル干渉フィルタを通したが、臭化エチジウムでは５２０～５５０ナノメートル励起を使用した。ＳＹＢＲ™グリーンＩでは、５２０～５５０ナノメートルの放射をモニタした。臭化エチジウム蛍光は５８０～６２０ナノメートル・バンドパスフィルタ経由で観察した。アクリジン・オレンジの信号は緑色（５２０～５５０ナノメートル）の赤色（＞６１０ナノメートル）蛍光に対する比として取った。増幅前のサンプルの蛍光を３５サイクル後の蛍光（最高９４℃、６０℃で２０秒）と６０℃で比較した。蛍光の増加はＳＹＢＲ™グリーンＩで５．３倍、臭化エチジウムで１．７倍、アクリジン・オレンジで１．２倍だった。別の実験で、ＳＹＢＲ™グリーンＩからの蛍光は７０℃で３０分以上にわたり安定していた。また便利なことに可視光で励起され臭化エチジウムより変異原物質になりにくいと主張されている。全例でのバックグラウンド蛍光は主としてプライマーから発していた。

ＳＹＢＲ™グリーンＩは主として二重鎖と一重鎖核酸の間の優れた識別能に由来する高感度のため、ＰＣＲの蛍光モニタリングに適した二重鎖特異性染料である。ＳＹＢＲ™グリーンＩはあらゆる増幅で使用できかつ安価である。さらに、後述するように溶解曲線の分析で生成物特異性を得ることができる。

ハイブリダイゼーション・プローブ用の共鳴エネルギー転移染料選択。蛍光共鳴エネルギー転移は２つの蛍光物質が物理的に接近し一方の蛍光物質の放射スペクトルが他方の励起スペクトルとオーバラップしている場合に発生し得る。蛍光共鳴エネルギー転移の導入理論は多くの最近の紹介論文に見ることができる。共鳴エネルギー転移のレートは：

（８．７８５Ｅ－５）（t^{-1}）（k^{2}）（n^{-4}）（q_D）（R^{-6}）（J_{DA}）

ただし、

ｔ＝受容体欠如時の供与体の励起状態寿命

k_2供与体と受容体の間の指向性係数

ｎ＝介在する媒体の可視光反射率

q_D＝受容体欠如時の供与体量子効率

Ｒ＝供与体と受容体の間の距離（オングストローム単位）

J_{DA}＝オーバラップする全波長に対して（F_D）（e_A）（W^4）の積分

ここでF_D＝供与体のピーク正規化蛍光スペクトル

またe_A＝受容体の分子吸光係数（$M^{-1}cm^{-1}$）

Ｗ＝波長（ナノメートル）とする。

何らかの任意の供与体と受容体で、５０％共鳴エネルギー転移が発生する距離を計算することができこれをR_0で表わす。共鳴エネルギー転移のレートは供与体と受容体の間の距離の６乗に比例するので、ＲがR_0から移動すると共鳴エネルギー転移は急激に変化する。２R_0では、非常に僅かな共鳴エネルギー転移しか発生せず、０．５R_0では他の形の脱励起（即ち衝突消光）が優勢でない限り転移効率はほぼ完全である。多様な供与体と受容体の対でのR_0の値が集積されており２２から７２オングストロームの間で変化している。

二重螺旋ＤＮＡでは、１０塩基が約３４オングストロームは離れている。供与体蛍光物質又は受容体蛍光物質でＤＮＡの塩基を標識することによって、ＤＮＡの螺旋構造を観察するためのスペクトル的定規として共鳴エネルギー転移を使用し４種類のＤＮＡ結合の構造を分析できる。共鳴エネルギー転移はハイブリダイゼーションのモニタとしても使用できる。標識したオリゴヌクレオチドが標識テンプレート鎖にハイブリダイゼーションされると、ＲはR_0より相当大きな値からR_0以下に移動し、共鳴エネルギー転移が急激に増加する。これ以外にも、２種類の標識プローブを同じテンプレート鎖にハイブリダイゼーションして蛍光エネルギー転移に同様の変化を起こすことができる。

ハイブリダイゼーションをモニタするために実際に共鳴エネルギー転移を使用するのは、要求される感度とどの程度の時間が使えるかによって変わる。１ナノモル標識プローブでの競合ハイブリダイゼーション技術を使用すると、ＰＣＲ増幅ＤＮＡは４０℃で１５分後に検出された。もっと高速の信号生成が望ましい。ハイブリダイゼーションに秒単位しか必要でないなら、ＰＣＲ生成物は増幅の各

サイクルで便利に定量できる。さらには、プローブハイブリダイゼーションの範囲を温度サイクル内でモニタできる。

ハイブリダイゼーションは秒単位の処理である（Ｂ．ヤング＆Ｍ．アンダーソン、溶液ハイブリダイゼーションの定量分析（B. Young & M. Anderson,Quantitative analysis of solution hybridization, In:Nucleic AcidHybridization:A Practical Approach 47-71, (B. Hames, S. Higginseds.,1985))参照）。プローブの濃度が標的濃度より大幅に高い場合、ハイブリダイゼーション・レートはプローブ濃度に逆比例する。たとえば、プローブ濃度を２倍にするとハイブリダイゼーション時間は半分に減少する。ハイブリダイゼーションはハイブリダイゼーション部位がポリメラーゼ延長で被覆される前に起こる必要があるため、高いプローブ濃度がＰＣＲ中のサイクル後とモニタリングに必要である。

ＰＣＲ中のハイブリダイゼーション・モニタリングに必要な高いプローブ濃度はユニークな特性の共鳴エネルギー転移対を要求する。供与体(Ｄ)と受容体(Ａ)

の対の光による励起を考えてみる。直接励起されたＤとＡの蛍光の数は励起波長での各蛍光物質の消光係数（ｅ）に比例することになる、即ち、

直接励起されたＤ分子数＝（Ｋ）（e_D）

直接励起されたＡ分子数＝（Ｋ）（e_A）

ここでＫは比例定数である。供与体の脱励起は、蛍光、共鳴エネルギー転移、その他の熱的消光と要約される過程によって発生する。P_F＝共鳴エネルギー転移の確率、P_{TD}＝供与体の熱的消光の確率、とすると、供与体蛍光の確率は

$1-P_F-P_{TD}$

また蛍光を発する供与体分子数は

（Ｋ）（e_D）（$1-P_F-P_{TD}$）

である。供与体放射ウィンドウ（たとえばバンドパスフィルタ・ウィンドウ）内での供与体放射を検出する確率をP_{DD}とすると、観察される供与体放射個数は

（P_{DD}）（Ｋ）（e_D）（$1-P_F-P_{TD}$）

ここで、励起された受容体蛍光物質数が直接励起された受容体と共鳴エネルギー転移により励起された受容体の和であるので、

（Ｋ）（e_A）＋（Ｋ）（e_D）（P_F）

P_{TA}＝受容体の熱的消光の確率とすると、受容体蛍光の確率は１－P_{TA}また蛍光を発する受容体分子の個数は

［（Ｋ）（e_A）＋（Ｋ）（e_D）（P_F）］［１－（P_{TA}）］

また受容体放射ウィンドウ内で受容体放射を検出する確率をP_{AA}とすると、観察される受容体放射の個数は

（P_{AA}）［（Ｋ）（e_A）＋（Ｋ）（e_D）（P_F）］［１－（P_{TA}）］

最後に、受容体放射ウィンドウ内で供与体放射を観察する確率をP_{DA}とした場合に、受容体放射ウィンドウ内で観察される（ＤとＡの両方の）放射の個数は

（P_{AA}）［（Ｋ）（e_A）＋（Ｋ）（e_D）（P_F）］［１－（P_{TA}）］＋

（P_{DA}）（Ｋ）（e_D）（１－P_F－P_{TD}）

蛍光測定は相対的でありＫが全ての項で存在することから、Ｋを除外して式を組み立て直すと、供与体ウィンドウで観察される強度は（供与体励起）－（エネルギー転移）に比例し：

１）（e_D）（p_{DD}）（１－P_{TD}）－（e_D）（P_{DD}）（P_F）

また受容体ウィンドウで観察される強度は（受容体励起）＋（エネルギー転移）＋（受容体ウィンドウでの供与体放射）に比例するから、

２）（e_A）（P_{AA}）（１－P_{TA}）＋（e_D）（P_{DD}）（P_F）（１－P_{TA}）

＋（e_D）（P_{DA}）（１－P_{TD}－P_F）

共鳴エネルギー転移が増加すると、供与体信号が減少して受容体信号が増加する。百分率信号変化は各ウィンドウ内のバックグラウンド光強度に依存する。プローブの濃度が高いと、バックグラウンド光強度が高い。ＰＣＲ中、標的（生成物）濃度変化をモニタする必要がある場合、供与体濃度を標的濃度と一致させることは可能ではない。過剰な供与体分子が供与体及び受容体ウィンドウの両方でのバックグラウンド光強度に関係し部分的にエネルギー転移現象を隠蔽する。受容体ウィンドウでのバックグラウンド光は受容体ウィンドウ内での供与体放射だけではなく受容体の直接励起からも発生する。このバックグラウンドはe_Aが低くP_{DA}も低いと最少にできる。

フルオレセイン／ローダミン蛍光エネルギー転移対は、核酸検出に共通に使用され、高いバックグラウンド蛍光を有している。直接受容体励起（e_A、ほぼ１０％e_{max}）と、受容体放射（P_{DA}、ほぼ２０％ピーク放射）を検出するために使用される波長での供与体放射の双方が高い。この対はプローブ濃度が標的濃度に近くハイブリダイゼーションを完了するのに充分な時間が与えられている場合にハイブリダイゼーションをモニタするために使用できる。高いプローブ濃度が必要とされＰＣＲでのテンプレート濃度が連続的に変化することから、ＰＣＲの連続モニタでは蛍光体の有用な対ではない。

ハイブリダイゼーションによるＰＣＲ中の生成物濃度のモニタリングは、受け入れ可能な共鳴エネルギー転移対が見付からなかったため過去においては不可能だった。共鳴エネルギー転移を直接「非競合的」ハイブリダイゼーション検出に使用する試みが幾つかなされてきた。たとえば、米国特許第５，５６５，３２２号では「受容体による再放射に関して観察されるエネルギー転移効率は比較的低い」と述べている。有意なハイブリダイゼーションが秒単位で起こせる程にまで充分に高いプローブ濃度では、バックグラウンド蛍光が高すぎる。

フルオレセインは恐らくもっとも広範に使用されている蛍光物質である。これの消光係数と量子効率は高く、顕微鏡下、イムノアッセイ、フローサイトメトリーで広く使用されている。これはローダミンと併せて共通に使用される共鳴エネルギー転移対での供与体である。Ｃｙ５は一般的な赤色発光蛍光物質で消光係数が非常に高い。Ｃｙ５のＮ－ハイドロキシサクシニミド・エステルの構造を図６に図示し、関連した染料であるＣｙ５．５の構造を図７に図示してある。これらの染料はインドジカルボシアニン染料で、フローサイトメトリーや自動蛍光シーケンサで共通に使用されており、アマシャム（ペンシルバニア州ピッツバーグ）から入手できる。フルオレセインとＣｙ５はどちらもオリゴヌクレオチドへの直接自動組み込み用にアミダイトとして商業的に利用できる。しかし、Ｃｙ５はフルオレセインとの共鳴エネルギー転移対として報告されたことがない。直感的に理解されるようにフルオレセイン放射とＣｙ５吸収は共鳴エネルギー転移を考慮するには充分にオーバラップしていない。フルオレセインの放射スペクトルとオ

リゴヌクレオチドに付着したＣｙ５の吸収スペクトルは図８に図示してある。曲線の下側の領域を正規化すると、技術的スペクトルからのオーバラップは１９％である。Ｃｙ５．５の励起は約２５ナノメートルだけ赤色に変移しており、フルオレセイン放射とのオーバラップは約１５％にまで減少する。スペクトルの赤色、赤外領域での作業は測定機材の光学部品を選択する際に有利である。照明用にレーザーダイオードを使用でき、フォトダイオード検出器は優れた感度を有しており、大半の材料は関係のあるスペクトル領域で自発蛍光が最少である。

スペクトル的なオーバラップが低いにもかかわらず、フルオレセインとＣｙ５又はＣｙ５．５の一方とがＰＣＲ中のハイブリダイゼーションモニタリングに優れた共鳴エネルギー転移対を構成することが発見された。

実施例３

中間部プローブＣＡＡＡＣＡＧＡＣＡ　ＣＣＡＴＧＧＴＧＣＡ　ＣＣＴＧＡＣ

ＴＣＣＴ　ＧＡＧＧＡフルオレセイン（配列ＩＤ No. ３）とCy5－ＧＡＡＧＴＣＴＧＣＣ　ＣＴＴＡＣＴＧＣＣＣ　ＴＧＴＧＧＧＧＣＡＡ　Ｇ－ｐ（配列ＩＤ No.１８）それぞれ０．２μモルと０．８単位ＫｌｅｎＴａｑ１ポリメラーゼ（Ｔａｑポリメラーゼの５’－エクソヌクレアーゼ欠乏性亜種―米国特許第５，４３６，１４９号）を１０μｌ反応で用いた実施例２の手順にしたがって、１１０ｂｐβグロブリン・フラグメントを５０ｎｇヒトゲノムＤＮＡから増幅した。プローブは同一鎖でプライマーに中間部ハイブリダイゼーションし何らかの介在塩基なしにすぐ隣接していた。

プローブとプライマーは、従来技術で公知のように標準的ホスホラミダイト化学により、即ちファルマシア・バイオテック遺伝子アセンブラ・プラス(Pharmacia Biotech Gene Assembler Plus)（ニュージャージー州ピスカタウェイ）を使用して合成した。３’－フルオレセイン標識したプローブはフルオレセイン標識したＣＰＧカセット（グレン・リサーチ社、バージニア州スターリング）上で最終トリチルーＯＮをＣ１８逆相ＨＰＬＣ精製の補佐に用いて合成した。遅い溶出ピークを回収し、トリチル残基をポリパック（グレン・リサーチ社）で除去した。フルオレセイン標識オリゴヌクレオチドは５０％アセトニトリルで溶出しＣ１

８逆相ＨＰＬＣでもう一度精製した。５’－Ｃｙ５－標識プローブは３’末端の化学的リン酸化剤（グレン・リサーチ社）を用い、トリチル－ＯＦＦ合成中にＣｙ５アミダイト（ファルマシア社）を５’末端に追加して合成した。失敗した配列はＣ１８逆相ＨＰＬＣで除去した。プローブ純度はポリアクリルアミド電気泳動と染料及びオリゴヌクレオチドの吸光度でチェックした。

ＨＰＬＣは４×２５０ｍｍ Ｈｙｐｅｒｓｉｌ ＯＤＳカラム（ヒューレットパッカード社）で０．１Ｍトリエタノールアミン：酢酸移動相とアセトニトリル・グラジエントを用い１ｍｌ／分で行なった。溶出は吸光度（A_{260}）と蛍光（フルオレセインでは４９０ｎｍ励起、５２０ｎｍ放射、またＣｙ５については６５０ｎｍ励起、６７０ｎｍ放射）をモニタした。トリチレート及びフルオレセイン標識オリゴヌクレオチドは１０～２０％のアセトニトリル・グラジエントに溶出し、Ｃｙ５標識オリゴヌクレオチドは１０～４０％アセトニトリル・グラジエントに溶出した。

温度サイクルは、２０℃／毎秒のプログラム式アプローチ速度で９４℃０秒、アプローチ速度２０℃／毎秒で６０℃２０秒、また１℃／毎秒のアプローチ速度で７５℃０秒とし毛細管蛍光高速温度サイクラによった。温度サイクル中、フルオレセインとＣｙ５の蛍光はアニーリング・伸長セグメントの終りで各サイクルで取得した。共鳴エネルギー転移は増幅サイクル２６あたりで始まったフルオレセイン蛍光の減少とＣｙ５蛍光の増加の両方として観察された（図９）。一般に、フルオレセイン蛍光に対するＣｙ５の蛍光比は好適である。

フルオレセイン／Ｃｙ５対で予想しない良好な結果について、少なくとも部分的には説明を付けることができる。オーバラップ積分J_{DA}はスペクトルのオーバラップだけでなく、受容体の消光係数にも依存し（Ｃｙ５は６５０ｎｍで２５０，０００$M^{-1}cm^{-1}$の消光係数を有する）、波長の４乗で変化する。これらの要素のどちらも、スペクトル的オーバラップが低いとしてもＣｙ５で高いJ_{DA}に有利である。最近、フィコエリスリンとＣｙ７は、スペクトル・オーバラップが低いにもかかわらず、免疫蛍光に有効なタンデム・プローブであると示された。後

者の例で、ハイブリダイゼーション・プローブの標識としてのフルオレセインとＣｙ５．５の有用性が示されている。蛍光共鳴エネルギー転移は相互作用する染料がスペクトル的に低いオーバラップを有している場合でも核酸ハイブリダイゼーションをモニタするために使用することができる。フルオレセインとＣｙ５，Ｃｙ５．５，及びその他の赤色又は赤外放射線量をハイブリダイゼーションのモニタリング用共鳴エネルギー転移対として使用することは従前には認識されて来なかった。フルオレセインは６００ｎｍ、７００ｎｍに及ぶ長い放射「尾部」を有し遠赤色や赤外染料を励起するのに使用できる範囲を越えている。エネルギー転移レートはオーバラップ積分に依存するが、これも蛍光物質間の距離の６乗で起こる。共鳴エネルギー転移染料が接近するようにプローブが設計されている場合、転移レートは高い。少なくともフルオレセイン／Ｃｙ５，フルオレセイン／Ｃｙ５．５，及び同様の対で、蛍光物質が介在塩基なしに隣接プローブに付着される

上記実施例と同様に蛍光物質どうしが接近している場合に、共鳴エネルギー転移は衝突消光やその他の形のエネルギー損失より優位であるように見える。

ハイブリダイゼーション・プローブとしての共鳴エネルギー転移対の潜在的有用性は極小及び極大共鳴エネルギー転移での供与体及び受容体の光強度比の変化を観察することにより判定することができる。極小及び極大の転移を得る１つの方法としては、両方の蛍光物質を同一オリゴヌクレオチドに付着させホスホジエステラーゼによる消化の前後で蛍光比を測定することが挙げられる。

実施例４

２重標識フルオレセイン／Ｃｙ５プローブCy５－ＣＴＧＣＣＧ－Ｆ－ＴＡＣＴＧＣＣＣＴＧＴＧＧＧ　ＧＣＡＡＧＧｐ（配列ＩＤ No.１９）を標準ホスホラミダイト化学で合成した。ここでｐは末端３’リン酸（化学的リン酸化剤、グレン・リサーチ社）、Ｆは２－アミノブチル－１，３－プロパンジオール骨格を有するアミダイトとして自然の３炭素ヌクレオチド間リン酸ジエステル距離を保つために導入したフルオレセイン残基（クロンテック社、カリフォルニア州パロアルト）、Ｃｙ５はアミダイトとして添加（ファルマシア社）した。０．１Ｍトリ

スｐＨ８．０でのフルオレセイン蛍光に対するＣｙ５の比はホスホジエステラーゼ（シグマ、モンタナ州セントルイス）による完全水解の前後に得られた。蛍光比の変化は水解後に２２０倍だった。２重標識フルオレセイン／ローダミン・プローブＦ－ＡＴＧＣＣＣＴ*ＣＣＣ　ＣＣＡＴＧＣＣＡＴＣ　ＣＴＧＣＧＴｐ（配列ＩＤ No.２０）をパーキン・エルマー社（カリフォルニア州フォスターシティ）から購入した。ここでＦはフルオレセイン、*はアミノ・リンカー腕で改変Ｔ残基に付着させたローダミンである。蛍光比の（フルオレセインに対するローダミンの）変化はホスホジエステラーゼによる水解後に２２倍だった。

フルオレセイン／Ｃｙ５対からの潜在的信号はフルオレセイン／ローダミン対のそれより１０倍だった。

実施例５

ＰＣＲ中のフルオレセイン及びＣｙ５で標識した隣接ハイブリダイゼーション・プローブの比率、濃度、間隔の影響について研究した。βグロブリン配位と実施例３のプローブ対の増幅を用いCY５のフルオレセインに対する蛍光比の最大変化を観察した。極大信号はＣｙ５のフルオレセイン標識プローブに対する比が２：１の場合に発生した（図１０）。２：１の比では、最良の信号は、フルオレセイン・プローブ濃度０．２μモル、Ｃｙ５標識プローブ濃度０．４μモルで発生した（図１１）。ＰＣＲ中に隣接ハイブリダイゼーション・プローブの間で最適な介在塩基数も決定した。長さが同じでハイブリダイゼーション位置が僅かに変移している数種類のプローブを実施例３にしたがって合成し、βグロブリン標的にハイブリダイゼーションした場合に、プローブ間に０，１，２，３，４，又は６塩基が残るようにした。ＰＣＲ中で最高の信号は介在塩基数１で発生した（図１２）。ある程度の共鳴エネルギー転移が１５塩基の間隔又２５塩基でも検出されたが、もっと良好な転移は０～５塩基で発生した。

ヘラーら（米国特許第４，９９６，１４３号）は、蛍光物質間のヌクレオチド数が４から０ユニットに減少するとエネルギー転移効率が減少することを発見し

た。対照的にフルオレセイン／Ｃｙ５対による最高のエネルギー転移は介在ヌクレオチド数が０から２で見られた。

ハイブリダイゼーション・プローブ法。標的に隣接してハイブリダイゼーションする２つのプローブを合成し各々を共鳴エネルギー転移対の一方の蛍光物質で標識した場合、共鳴エネルギー転移はハイブリダイゼーションが起こった場合に増加する（図５Ｃ）。フルオレセイン／ローダミン対は核酸検出でもっとも共通に使用されている。

本発明の１つの側面はＰＣＲ生成物の検出のために配列特異性の均質ハイブリダイゼーション法を提供することである。どのようにすればこれを実現できるかは明らかではない。増幅中にハイブリダイゼーション・プローブを使用するのは

直感的に分かり辛い。プローブのハイブリダイゼーションとポリメラーゼ延長が両方とも起こり得るとは思われない。配列特異性の蛍光を得るためには、プローブをハイブリダイゼーションする必要があるが、ポリメラーゼがプライマー延長を完了し指数関数的にＤＮＡを増幅すべき場合にはプローブはハイブリダイゼーションできない。

この問題に対する１つの解決策は、２重標識した単一のプローブを使用し、共通の熱安定性ＤＮＡポリメラーゼの５’－エクソヌクレアーゼ活性を用いて延長中のプローブを割断し、これによって２つの蛍光物質を分離することである。この場合、蛍光信号はプローブ水解時に共鳴エネルギー転移対の分離から発生し（図５Ｂ）、隣接ハイブリダイゼーションによる蛍光物質の接近によるものではない（図５Ｃ）。しかし、２重標識プローブは作成が困難で、オリゴヌクレオチドへ少なくとも一つの蛍光物質を用手的に追加する必要があり、一般に相当以上の精製を必要とする。プローブは高価であり、２種類の２重標識プローブが標的の競合的定量又は突然変異検出に必要である。さらに問題なのは観察される蛍光が水解されたプローブの累積量によって変化することで、何らか任意のサイクルに存在する生成物の量に直接依存しないことである。これによってＰＣＲのプラトー域に達した後でも蛍光が連続的に増加する。最後に又もっとも重要なことに、プローブの水解はポリメラーゼ延長中に必ず発生するわけではなく、この効果は

良く理解されていない。たとえば、実施例４の２重標識フルオレセイン／Ｃｙ５プローブは、プライマーによって挟まれた場合にＰＣＲ中に非常に乏しい水解を示した。実際、数種類の２重標識フルオレセイン／Ｃｙ５プローブが、末端標識したプローブを含めて作成され、その全てが乏しい水解と増幅中の信号精製を示した。

隣接ハイブリダイゼーション・プローブのあるＰＣＲ生成物の均一な検出は５’－エクソヌクレアーゼ系に見られる問題の多くを解決する。隣接ハイブリダイゼーション・プローブの合成は、フルオレセインとＣｙ５両方のアミダイトが自動合成中の直接組み込み用に入手できるためと１つのプローブの２重標識化が必要とされないため、比較的簡単である。水解ではなくハイブリダイゼーション

から蛍光が得られるので、プローブ蛍光の温度依存性を変移検出と定量に用いることができる。しかし、ＰＣＲ生成物の均一検出に隣接ハイブリダイゼーション・プローブを用いることはこれまで報告されていない。驚くべきことに、信号精製のためのハイブリダイゼーションとプローブによってブロックされた領域を通るポリメラーゼ延長による増幅がどちらも起こり得る。

実施例６

１１０ｂｐβグロブリンフラグメントを、実施例３に記載した隣接フルオレセイン及びＣｙ５標識プローブを用いてゲノムＤＮＡから増幅した。１０μｌ反応に０．４Ｕ（Ｔａｑ）又は０．８Ｕ（Ｓｔｏｆｆｅｌフラグメント、パーキン・エルマー社、又はＫｌｅｎＴａｑ１）いずれか一方の酵素を使用した。特に示していない限り、温度サイクルはプログラム式アプローチ速度２０℃／毎秒で９４℃０秒、アプローチ速度２０℃／毎秒で６０℃２０秒、アプローチ速度１℃／毎秒で７５℃０秒とした。図１３は３０サイクルにわたってテンプレートを増幅した直後での２種類の隣接ハイブリダイゼーション・プローブによる蛍光の発生を示す。短時間の９４℃での変性後、温度を６０℃まで下げ約２０秒にわたり蛍光が増加した。信号強度は５’－エクソヌクレアーゼ活性を含む自然のＴａｑポリメラーゼよりもエクソヌクレアーゼ欠乏ポリメラーゼ（Ｓｔｏｆｆｅｌフラグメント）のほうが大きかった。約２０秒後、ポリメラーゼがプローブを移動および

／または水解すると蛍光は低下する。蛍光の相対的低下は、ポリメラーゼが５’－エクソヌクレアーゼ活性を有する場合（ＴａｑＤＮＡポリメラーゼ）のほうがこの活性を欠く場合（Ｓｔｏｆｆｅｌフラグメント）より僅かに早い。

図１４（上部パネル）において、９４℃と６０℃の間で温度をサイクルし６０℃で２０秒保持している。蛍光が最大になる２０秒の終りで蛍光を採取する。Ｔａｑ（ｅｘｏ$^{+}$）では良好な増幅が見られるが、蛍光の発生とアガロースゲル（ゲルは図示していない）両方で確認されるようにＳｔｏｆｆｅｌフラグメント（ｅｘｏ$^{-}$）では発生しない。しかし、６０℃での時間を２０秒から１２０秒に延長すると（図１４，中央パネル）、ｅｘｏ$^{-}$ポリメラーゼも良好に増幅する。ｅｘ

ｏ$^{-}$ポリメラーゼによるプローブ移動速度が遅いことは、見かけ上ｅｘｏ$^{+}$ポリメラーゼより効率的な増幅に６０℃でさらに時間を必要とする。ｅｘｏ$^{-}$ポリメラーゼに必要な時間は６０℃から７５℃へ温度をゆっくりと上げることによって減少できる（図１４，下部パネル）。ポリメラーゼはプローブに到達すると停止する。しかし、プローブ溶解温度では、プローブがテンプレートを溶解しポリメラーゼは鎖の重合完了まで妨害されずに進行する。重合はプローブ溶解後に温度があまり急速に上昇しない限り完了する。図１４は（下部パネル）ｅｘｏ$^{+}$ポリメラーゼ１種類（Ｔａｑ）とｅｘｏ$^{-}$ポリメラーゼ２種類（Ｓｔｏｆｆｅｌフラグメントと Ｋｌｅｎ Ｔａｑ１）を示す。

エクソヌクレアーゼ活性が存在する場合、幾つかのプローブは大幅増幅による蛍光の減少によって明らかになるように各サイクルで水解されている。これは図１３及び図１４（中央と下部のパネル）で観察されるが、ｅｘｏ$^{-}$ポリメラーゼでは発生しない。蛍光が大幅増幅で安定していることから、Ｋｌｅｎ Ｔａｑ１などのｅｘｏ$^{-}$ポリメラーゼが適当である。

隣接ハイブリダイゼーション・プローブを使用してのＰＣＲのモニタリングが成功するかどうかは幾つかの要因によって決まる。共鳴エネルギー転移は隣接ハイブリダイゼーション・プローブ間に０から２個の介在塩基が存在する場合に最

大になる。プライマーがプローブ・ハイブリダイゼーション領域で拡張する前にプローブにハイブリダイゼーションする鎖の一部を増加させるには、プローブ溶解温度をプライマー溶解温度より高くすべきである（望ましくは＞５℃）。

サイクル毎の蛍光。ゲル電気泳動によるＤＮＡ増幅における従来のエンドポイント分析では生成物のサイズを同定して純度を推定している。しかし、増幅は最初は確率論的に、次に指数関数的に、最後には停滞的に行なわれるので、エンドポイント分析の使用は定量に限られる。本発明の１つの側面には、ハイブリダイゼーション・プローブによる初期テンプレートのコピー数の定量のためのサイクル毎のモニタリングが含まれる。当業者には理解されるように、ＤＮＡ増幅を行

なっている多数サンプルのサイクルあたり１回のモニタリングは強力な定量ツールである。サイクル毎モニタリングは各サイクルの拡張又はアニーリング／拡張組み合わせフェーズの間に蛍光を観察し蛍光を生成物濃度と相関することによって実現される。

実施例７

３種類の異なる蛍光技術によりＰＣＲのサイクル毎モニタリングを行なった。蛍光は、（ｉ）二重鎖特異性染料であるＳＹＢＲ™グリーンＩ、（ｉｉ）２重標識水解プローブのエクソヌクレアーゼ開裂後のローダミンによるフルオレセイン消光の減少、（ｉｉｉ）隣接ハイブリダイゼーション・プローブによるフルオレセインからＣｙ５への共鳴エネルギー転移、によりモニタした。増幅試薬及び条件は実施例２に記載した通りとした。ヒトβグロブリン・プライマーであるＲＳ４２／ＫＭ２９（５３６塩基対）とＰＣ０３／ＰＣ０４（１１０塩基対）についてはＣ．Ｔ．ウィットワーら、熱気による毛細管内自動ポリメラーゼ連鎖反応(C. T. Wittwer et al.,Automated polymerase chain reaction in capillary tubes with hot air, 17 Nucl. Acids. Res. 4353 - 4357(1989))に説明されており、本明細書で参照に含まれる。βグロブリンの温度サイクルは最高９５℃、最低６１℃、７２℃１５秒間で温度間の平均レートは５．２℃／秒だった。βアクチン・プライマーとフルオレセイン／ローダミン２重標識プローブはパーキン・エルマー（番号Ｎ８０８－０２３０）から入手した。βアクチンの温度サイクルは

最高９４℃、６０℃１５秒間で温度間平均レートは６．２℃／秒だった。単一標識プローブである５’－ＣＡＡＡＣＡＧＡＣＡ　ＣＣＡＴＧＧＴＧＣＡＣＣＴＧＡＣＴＣＣＴ　ＧＡＧＧＡ－フルオレセイン－３’（配列ＩＤ No.３）と５’－Ｃｙ５－ＡＡＧＴＣＴＧＣＣＧ　ＴＴＡＣＴＧＣＣＣＴ　ＧＴＧＧＧＧＣＡＡＧｐ（配列ＩＤ No.４）を実施例３の通りに合成した。これらの隣接プローブは同一ＤＮＡ鎖のＰＣ０３／ＰＣ０４βグロブリン・プライマー対と中間部ハイブリダイゼーションし塩基対１個で隔てられる。温度サイクルは最高９４℃、５９℃２０秒間で温度間平均レートは７．０℃／秒だった。ハイブリダイゼーション・プローブ（βアクチンとβグロブリン）は各々０．２μモルで使用した。

ＳＹＢＲ™グリーンＩにより多数サンプルを各サイクルで一度にモニタする場合、１０の７乗から１０の８乗の初期テンプレート濃度範囲が図１５に図示してあるように識別できる。この増幅は２重特異性染料としてＳＹＢＲ™グリーンＩを用いたβグロブリン遺伝子の５３６塩基対フラグメントによるものである。各サンプルのパーセント最大蛍光でデータを正規化した場合、初期１００コピーが１０コピーから明らかに分離した。しかし、１と１０コピーの間の相違は微妙（marginal）であり、サンプルあたり０及び１平均コピー間での相違は観察されなかった。

これとは対照的に、配列特異性プローブは同様のダイナミックレンジを有するが、陰性対照から単一の初期テンプレートコピーでさえ識別するように見える。５’－エクソヌクレアーゼ・プローブ（βアクチン・フラグメント、図１６）の信号生成はＤＮＡ合成に依存する他、２重標識プローブの蛍光物質間のハイブリダイゼーションと水解を必要とする。この水解は消光を減少させ、フルオレセインのローダミン放射に対する蛍光比が増加する。二重鎖染料からの蛍光が過剰サイクルでレベル低下する一方（図１５）、エクソヌクレアーゼ・プローブからの信号は各サイクルで増加し続ける（図１６）。実質生成物が合成されていないとしてもプローブのハイブリダイゼーションと水解は起こり続ける。テンプレートのコピー数が１０の３乗未満に減少すると、信号強度は減少するものの、陰性対照信号が安定していることから少ないコピー数をまだ定量することができる。

図１７において、増幅は隣接ハイブリダイゼーション・プローブを用いてモニタしておりＣｙ５のフルオレセイン蛍光に対する比率として表現している。蛍光比の変化は大半が共鳴エネルギー転移からのＣｙ５蛍光の増加によるものである（図９）。２重標識水解プローブとは対照的に、ハイブリダイゼーション・プローブの蛍光信号はポリメラーゼがエクソヌクレアーゼ活性を含む場合高いサイクル数で減少する（図１４も参照）。

ＰＣＲ中のハイブリダイゼーションの共鳴エネルギー転移検出に２種類の異なる方法を用いる本発明の実現可能性をここで示すことにする。第一の方法は、一方が３’末端にフルオレセイン、他方が５’末端にＣｙ５を標識してある２種類の隣接ハイブリダイゼーション・プローブを使用する。ＰＣＲ中に生成物が多くなると、プローブは各サイクルのアニーリング・セグメントの間に互いに隣接してハイブリダイゼーションする。第２の方法はＣｙ５を標識したプライマーと単一のハイブリダイゼーション・プローブを使用する。標識プライマーは増幅中にＰＣＲ生成物に組み込まれ単一のハイブリダイゼーションしか必要としない。

実施例８

Ｃｙ５標識プライマーとフルオレセイン標識ハイブリダイゼーション・プローブの間の共鳴エネルギー転移によるＰＣＲのサイクル毎モニタリングを行なった。これを、隣接Ｃｙ５／フルオレセイン・ハイブリダイゼーション・プローブによるモニタリングと比較した。Ｃｙ５標識プライマーはＣＡＡＣＴＴＣＡＴＣＣＡＣＧＴ*ＴＣＡＣＣ（配列ＩＤ No.２１）、ただしＴ*はＣｙ５を付着させた改変Ｔ塩基、またこれに対応するプローブはＧＴＣＴＧＣＣＧＴＴ　ＡＣＴＧＣＣＴＧＴ　ＧＧＧＧＣＡＡ－フルオレセイン（配列ＩＤ No.２２）だった。隣接ハイブリダイゼーション・プローブはＣＣＴＣＡＡＡＣＡＧ　ＡＣＡＣＣＡＴＧＧＴ　ＧＣＡＣＣＴＧＡＣＴＣＣ－フルオレセイン（配列ＩＤ No.２３）、及びＣｙ５－ＧＡＡＧＴＣＴＧＣＣ　ＧＴＴＡＣＴＧＣＣＣ　ＴＧＴＧＧＧＧＣＡＡｐ（配列ＩＤ No.２４）だった。ハイブリダイゼーション・プローブは実施例３にしたがって合成し０．２μモルで使用した。Ｃｙ５標識プライマーは２ステ

ップで合成した。自動合成を用いて所望するＴ位置にアミノ・モディファイアＣ６ｄＴ（グレン・リサーチ社）を組み込んだ。次に、Ｃｙ５の１価Ｎ－ハイドロキシサクシニミド・エステル（図６）をメーカー指示（アマシャム）にしたがってアミノ・リンカに用手的に結合した。ＨＰＬＣ精製は実施例３に説明した通りに行なった。

Ｃｙ５標識プライマー（０．５μモル）をＰＣＯ４の代わりに使用して、実施例３と同様にヒト・ゲノムＤＮＡから１１０塩基対βグロブリンフラグメントを

増幅したが、１０μｌあたりＴａｑポリメラーゼ０．４単位を使用した点が異なる。隣接ハイブリダイゼーション・プローブでも同一のβグロブリン・フラグメントの増幅をモニタした。温度サイクルは９４℃０秒及び６０℃２０秒で行なった。蛍光は各サイクルとも１回アニーリング／拡張区間の終りにモニタした。両方法において、Ｃｙ５の共鳴エネルギー転移はハイブリダイゼーションで増加しており、Ｃｙ５のフルオレセイン蛍光に対する比としてプロットしてある（図１８）。

追加の実験において、Ｃｙ５標識とフルオレセイン標識を隔てている塩基数を変化させた。最高の蛍光共鳴エネルギー転移は蛍光物質間の約４～６塩基で観察されたが、信号は少なくとも１５塩基まで検出可能だった。

水解プローブとは対照的に、ハイブリダイゼーション・プローブからの蛍光信号は累積したものではなく、各アニーリング・フェーズの間に新規に発生している。ハイブリダイゼーションは疑似一次反応であるため蛍光が生成物濃度の直接的指標である。プローブ濃度が生成物より大幅に高いことからプローブにハイブリダイゼーションした生成物の一部分は生成物濃度に依存しない。こうした特性は標識プライマーと一緒に単一のハイブリダイゼーション・プローブを使用することで定量のために生成物堆積の優れたモニタを提供し得るであろうことを示している。サイクル毎モニタリング中の異なる蛍光技術に固有の変動も定量には重要である。

実施例９

３種類の異なる蛍光モニタリング方の各々について実施例２にしたがってＤＮＡ増幅を実施した。プライマーＫＭ２９とＰＣ０４からの２０５塩基対ヒトβグロブリン・フラグメントの増幅においてＳＹＢＲ™グリーンＩを１：１０，０００倍希釈で使用した。水解プローブと条件は実施例７に指定したものである。ハイブリダイゼーション・プローブＴＣＴＧＣＣＧＴＴＡ　ＣＴＧＣＣＣＴＧＴＧＧＧＧＣＡＡＧ－フルオレセイン（配列ＩＤ No.５）をＫＭ２９、またＣｙ５標識プライマーＣＡＡＣＴＴＣＡＴＣＣＡＣＧＴＴ*ＣＡＣＣ（配列ＩＤ No.６）と用い、ここでＴ*は実施例８と同様に合成したＣｙ５標識Ｔ塩基とした。全ての増幅は１５，０００テンプレート・コピーによる１０複製（ヒトゲノムＤＮＡ ₅₀ｎｇ／１０μｌ）で行なった。温度サイクルは長さ３１秒（最高９４℃、６０℃２０秒間、温度間平均レート６．２℃／秒）だった。蛍光はアニーリング／拡張フェーズの１５秒目から２０秒目の間で各サンプルについて観測した。

図１９ではＰＣＲについて３種類の蛍光モニタリング技術を比較できる。蛍光プローブは二重鎖ＤＮＡ染料ＳＹＢＲ™グリーンＩ（図１９Ａ）２重標識フルオレセイン／ローダミン水解プローブ（図１９Ｂ）、フルオレセイン標識ハイブリダイゼーション・プローブとＣｙ５標識プライマー（図１９Ｃ）である。全部のプローブがサイクル２０付近で発生する検出可能な蛍光に対してほとんど同じ感度を有していた。増幅を延長すると、信号は水解プローブに併せて増加を続け、ＳＹＢＲ™グリーンＩで同等、またハイブリダイゼーション・プローブで僅かに減少した。３種類の蛍光モニタリング技術の精度は図１９Ｄで比較している。平均±標準偏差が各点についてプロットしてある。データは基線以上の蛍光比（サイクル１１～１５の平均として取った）の変動係数（標準偏差／平均）としてプロットした。

水解プローブからの蛍光比変化はハイブリダイゼーション・プローブからのそれより大きい（図１９Ｂ及び図１９Ｃ）が、水解プローブからの蛍光の変動係数の方が大きい（図１９Ｄ）。つまり、ハイブリダイゼーション・プローブ法から得られる蛍光は、絶対信号レベルが低いとしても、水解プローブを用いるより正

確である。これは一般的な２重標識水解プローブに勝るハイブリダイゼーション・プローブの予期しなかった利点である。

初期テンプレート・コピー数の定量。

定量ＰＣＲは医生物学的研究と臨床検査の双方で重要な技術となった。定量処理は標的配列の既知のコピー数を含むサンプルの標準曲線を作ることを含む。未知のサンプルのコピー数は既知の値の間に外挿することで決定される。完全な増幅曲線が存在するＤＮＡ量に比例した信号をもたらす蛍光、放射線、又は何らかの他の方法を用いてサイクル毎にモニタされる場合、分析には多くのデータ点を利用でき、標準又は未知を表わすのにどの値を選択するかは明確ではない。従来技術では信号の「閾値」を選択して標準又は未知が代表的な値としてその閾値と交差する時のサイクル数を使用している（ヒグチ＆ワトソンのＥＰＡ０　６４０８２８　Ａ１出願を参照）。このアプローチは増幅曲線で利用可能なデータのうちの非常に少ない量を使用するものである。さらに、閾値の割り当ては非常に主観的であり意識的又は無意識的な偏倚を受ける。非線形カーブフィッティング技術を増幅曲線のデータに適用することによりもっと多くの利用可能なデータを客観的に使用することができる。望ましくは、基本となる過程の要因をモデル化することによって増幅曲線の形状を記述する式を見付けるのが良い。

多数の異なる式を用いて増幅中に作成したデータをカーブフィッティングすることができる。ＤＮＡ増幅は代表的には対数線形セグメントを有するのでこのセグメントのデータをＤＮＡ増幅で想定したのと同様の指数関数的増加を記述する式に当てはめることができる。ＤＮＡ増幅の対数線形部分は次式によって記述できる：　$y = A^{*}[DNA]^{*}(1+E)^{n}$

ここでＡは信号の単位をＤＮＡの単位に変換する倍率係数、［ＤＮＡ］は反応におけるＤＮＡの開始濃度、Ｅは反応の効率、ｎはサイクル数である。

定量処理は、（１）既知の標準をこの式に当てはめてパラメータＡとＥが浮動するようにし、（２）標準からＡとＥの値を用いて未知のサンプルを式に当てはめ［ＤＮＡ］が浮動するようにする。この技術はもっと多くのデータを使用しており、もっとも情報量が豊富であろうと思われるデータの一部である対数線形部

分を使用している。図２０，図２１，図２２はこのアプローチの例を示す。精製ＰＣＲ生成物の１０倍希釈を標準曲線として増幅し「未知の」ヒトゲノムＤＮＡ鎖を用いた。図２０は対数線形部分が使用者又はソフトウェアどちらかによって簡単に同定されることを示している。図２１は１０の４乗コピー標準への式ｙ＝Ａ＊［ＤＮＡ］＊（１＋Ｅ）"の適用を示す。図２２はＡとＥについて数個の標準

からの平均値を使用し［ＤＮＡ］を適用する。適用した値１６，７００はゲノムＤＮＡの単一コピー遺伝子についての理論値（１５，０００コピー）に非常に近い。

増幅曲線のデータ全部を使用するとバックグラウンド・レベルとプラトー値が含まれる。高いコピー数ではプラトーが情報量豊富でないものの、低いコピー数では開始コピー数に比例することが多い。バックグラウンド・レベルは信号の有意な増加を示す最初の点を決定するのに有用であろう。この時点でＤＮＡ増幅曲線の形状に関係する全ての要因が既知ではないので、１つのアプローチで曲線の形状を記述する。図２３は蛍光ハイブリダイゼーション・プローブを用いてＤＮＡテンプレート濃度の５桁の大きさ範囲を検出する増幅曲線を示す。各々の曲線は次式にフィッティングする：　ｙ＝｜（ａｓ＊ｘ＋ａｂ）－（ｄｓ＊ｘ＋ｄｂ）｜／（１＋（ｘ／ｃ）＾ｂ）＋（ｄｓ＊ｘ＋ｄｂ）

ここで「ａｓ」は傾斜線のバックグラウンド、「ａｂ」はバックグラウンド線のｙ切片、「ｄｓ」はプラトー線の傾き、「ｄｂ」は傾斜線のｙ切片、「ｃ」はサイクル数で、反応はバックグラウンドからプラトーの中央（A_{50}）である。また「ｂ」は増幅の対数線形部分の傾きである。

この式はこの増幅データに良好なカーブフィッティングを示し、図２４はA_{50}の値が７桁の大きさにわたる開始コピー数の対数と良く相関していることを示す。図２５は水解プローブを用いて５桁の大きさ範囲にわたるＤＮＡテンプレートを検出した増幅からのデータに適用した同じ式を示す。この式はこの増幅データに良好なカーブフィッティングを示しており、図２６はA_{50}の値が開始コピー数の対数と良く相関していることを示している。これは式がハイブリダイゼーション・プローブ増幅曲線のシャープなプラトー群と水解プローブ曲線の安定的に増

加する「プラトー」群の双方に対して良好なカーブフィッティングを与えることから全カーブフィッティング・アプローチの柔軟性を明示している。

全カーブフィッティングはこの式に限定されない。図２７は次式への３種類の濃度のＤＮＡテンプレート・フィッティングの増幅を示している：

ｙ＝（（（ａｓ＊ｘ＋ａｂ）－（ｄｍａｘ＊ｘ／ｄｄ＋ｘ）／（１＋（ｘ／ｃ）

＾ｂ））＋（ｄｍａｘ＊ｘ／ｄｄ＋ｘ）

これは最初の６パラメータの式と似ているが直線ではなく双曲線によってプラトーが定義されている点が異なっている。図２８はこの式についてのA_{50}が開始コピー数に良く相関することを示す。

A_{50}を上記実施例では用いたが増幅プロファイルにおいて特定の技術がもっと頑丈に低いか又は高い場合にバックグラウンドとプラトーの間のレベルを選択できる。たとえば一連の増幅標平曲線を開始コピー数とA_{50}、Ａ４０，Ａ３０，A_{20}，A_{10}の間の最高の相関について評価する。既知の開始コピー数と最も良く相関する増幅のレベルが決定される。これは違う検出系では異なったものになる。図１９は各種検出システムでの変動係数を示す。最も良く予測している増幅レベルは変動係数が最低のレベルになり易いと思われる。

ＤＮＡ増幅反応自体が良く理解されるようになると、物理的処理を反映するパラメータを有する他の式を用いることができる。ＤＮＡ増幅曲線のプラトーは異なる反応で異なった原因を有している。これはプライマーが後の方のサイクルで生成物アニーリングを完了できないことに由来することが多い。この効果は反応生成物濃度の自乗に依存するパラメータで捕捉できる（アニーリング・レートは生成物濃度の自乗に比例する）。プラトーの別の原因はプライマーの欠乏であり得る。プライマーで制限される反応は特徴的な形状を有し、識別し得る非常にシャープなプラトーを有している。プライマーで制限される反応のフィッティングはこのシャープな頂点を定義するパラメータを含む。酵素制限反応は非常に丸いプラトーを有しておりこれに合わせたカーブフィッティングができる。重み付け因子は任意のシステムで既知の変動係数を反映して信頼性の高いデータ点程重くなるように重み付けする工夫ができる。増幅プロファイルのより多くの点をカー

ブフィッティングすることにより、開始コピー数のより正確で頑丈な推定を得ることができる。１つまたはそれ以上のこれらのカーブフィッティング・パラメータを用いて未知のサンプルの開始コピー数を推定することができる。

ＰＣＲの連続蛍光モニタリング。本発明の特徴である連続モニタリング、即ち

各ＰＣＲサイクル内での多数回モニタリングについてここで議論する。ＰＣＲ中の蛍光モニタリングは一定温度で各サイクル中に１回ずつ行なうことができるが、本発明はＰＣＲサイクル全体を通しての連続モニタを提供することの重要な利点を提供する。蛍光が温度変化につれて変化することから温度は重要である。図２９Ａと図２９ＢはＳＹＢＲ™グリーンＩについて温度と蛍光の間の逆比例関係を示している。これは温度サイクル中の困惑するような作用で、一定の拡張温度でサイクルあたり１回蛍光を考慮することで通常なら排除される。しかし、本発明によれば、温度変化中の蛍光をモニタするのは非常に情報量が豊富である。本発明以前には、各サイクル１回ずつに対向する各サイクル内の連続的な蛍光モニタリングは実施されていない。本発明によれば、時間、温度と蛍光を毎秒、２００ミリ秒毎、１００ミリ秒毎、又はもっと高頻度で取得する。このようなデータからは生成物の変性、アニーリング、拡張についてと従来利用できた方法では入手できなかった高速サイクル中のプローブ・アニーリング及び溶解についての細かな詳細を見つけ出すことができる。

実施例１０

プライマー５’－ＣＧＴＧＧＴＧＧＡＣ　ＴＴＣＴＣＴＣＡＡＴ－３’（配列ＩＤ no.１）及び５’－ＡＧＡＡＧＡＴＧＡＧ　ＧＣＡＴＡＧＣＡＧＣ－３’（配列ＩＤ no.２）（ジーンバンク配列ＨＶＨＥＰＢ）を使用して精製ＰＣＲ生成物の１０の６乗個コピーからhepatitis BB型肝炎ウィルス表面抗原遺伝子の１８０塩基対フラグメントを増幅した。実施例２の増幅条件にしたがつたが、反応には１：２０，０００倍希釈したＳＹＢＲ™グリーンＩと２ミリモルの$MgCl_2$を含んでいた点が異なる。各温度サイクルは長さ２７秒(最高９２℃、最低５９℃、７０℃５秒間、温度間平均レート３．０℃／秒)とした。時間、温度、２チャンネルの蛍光を２００ミリ秒毎に測定し蛍光対サイクル数及び蛍光対温度プロ

ットとして連続表示した。図３０はサイクル１０からサイクル３４までの温度、時間、蛍光の三次元プロットを示す。またこの３Ｄ曲線は温度対時間、蛍光対時間、蛍光対温度の２次元プロットとして図３０に投影されている。図３０の温度対時間

投影図は各サイクル毎に反復して基本的に図３で説明したのと同じ情報を提供する。蛍光が温度に逆比例して変化しているので、図３０に図示してある初期サイクルでの蛍光対時間投影は温度対時間プロット（図２９参照）を伸縮した鏡像になっている。生成物が蓄積してくると、二重鎖生成物により蛍光が全ての温度で増加する。しかし変性温度では一重鎖ＤＮＡしか存在していないため蛍光は基線レベルに戻る。図３０に図示したに重鎖染料の蛍光対温度投影は時間軸を省いてありＤＮＡ増幅中の鎖の状態の温度依存性を示している。

実施例１１

ヒトβグロブリン遺伝子の５３６塩基対フラグメントを５μｌ容量で２５ｎｇのゲノムＤＮＡと１：１０，０００希釈ＳＹＢＲ™グリーンＩから増幅した。各温度サイクルは長さ２８秒（最高９５℃、最低６１℃、７２℃１５秒間、温度間平均レート５．２℃／秒）だった。他の条件は図３０において説明したのと同じである。サイクル１５からサイクル４０を表示した。ＰＣＲ中の生成物鎖状態の温度依存性は図３１に図示してあるように蛍光対温度プロットを用いて明らかにした。図示した初期サイクルは同一に見え、低い温度での蛍光の非線形的増加があった。増幅が進むにつれ、温度サイクルはアニーリング及び変性温度の間のループが上昇するように見える。サンプルを加熱すると、変性が起こるまで蛍光は強い。サンプルが冷えると、蛍光が増加し、生成物アニーリングを反映している。温度が拡張中に一定の時、蛍光の増加は追加ＤＮＡ合成と相関する。

本開示の理解によって明らかになるように、サイクル内の連続モニタは従来技術ではこれまで利用できなかったＤＮＡ増幅の機構に対する洞察を提供できる。本発明を用いると、これまではほとんど理解されていなかったＤＮＡ増幅の多くの態様が識別可能である。たとえば、高速サイクル増幅は１秒未満で生成物変性

が起こることを主張しているが、一方で従来技術は１０秒から１分間の変性を使用している。本発明による二重鎖染料を用いてリアルタイムで蛍光モニタすることにより生成物の溶解を観察すると（図３０及び図３１）、短い変性時間を用いるのが効果的であることが示される。別の例として、既知の「プラトー効果」の多くの原因が示唆されているが、それらの間での識別にはほとんど利用できるデータがない。図３１に図示してあるように、生成物のアニーリングは非常に高速である。実際、増幅サイクルの後の方では、冷却中に、プライマー・アニーリング温度に達する前に、生成物の大半が各サイクルでアニーリングしている。これは高速サイクル装置で５～１０℃／秒の冷却レートとした時に発生する。もっと緩徐な、従来技術の温度サイクラによる生成物のアニーリングはさらに広範囲になるのでこの望ましくない効果が大きくなる。生成物アニーリングが主要な、そして恐らくは唯一の、「プラトー効果」の原因であるように思われる。

ここで排列特異性プローブの連続モニタリングについて考察してみる。本開示の理解によって分かるように、サイクル内の連続モニタリングはプローブ蛍光の性質を同定できる。

実施例１２

２重標識水解プローブ（βアクチン）及び隣接ハイブリダイゼーション・プローブ（βグロブリン）を実施例７と同様に用いて２００ミリ秒毎の増幅連続モニタリングを実施した。図３２Ａには、水解プローブでモニタした反応のサイクル２０～サイクル４５を図示してある。水解プローブは多くのプローブが水解されるにつれて温度による蛍光比の線形変化、及び蛍光の平行的な増加を示す。これとは対照的に、ハイブリダイゼーション・プローブからの蛍光比は温度でラジカルに変化する（図３２Ｂ、サイクル２０～サイクル４０）。アニーリング／拡張フェーズでは、プローブは一本鎖生成物にハイブリダイゼーションし、蛍光比(Ｃｙ５／フルオレセイン)が増加する。生成物変性温度までの加熱中に、プローブは約７０℃で解離し、バックグラウンド・レベルまで蛍光比が戻る。

実施例１３

１１０塩基対βグロブリン・フラグメントを４０μｌ容量で５０ｎｇのゲノムＤＮＡから増幅した。実施例３の増幅条件と隣接ハイブリダイゼーション・プローブにしたがい０．４単位のＴａｑポリメラーゼ又は０．８単位のＫｌｅｎＴａｑ１どちらかを用いた。蛍光は１００ミリ秒毎にモニタした。ＫｌｅｎＴａｑ１（図３３）とＴａｑ（図３４）を用いた蛍光対温度プロットは約７０℃でのプローブ溶解を示している。Ｔａｑのエクソヌクレアーゼ活性のため、ＫｌｅｎＴａｑ１での極大信号はＴａｑの信号より大きい。Ｔａｑを用いた後の方のサイクルでは、未反応プローブの濃度が減少するにつれて各サイクルの蛍光が減少し始める。温度、時間、蛍光の三次元プロットを図３５（ＫｌｅｎＴａｑ１）と図３６（Ｔａｑ）について示してある。

本発明による（１）各温度サイクル内での連続的蛍光モニタリングと（２）ハイブリダイゼーションの温度及び時間依存性の分析の組み合わせは他では得られない利点を提供する。図２はこれまで得られなかった情報がサイクル全体を通しての連続モニタリングによって抽出され得ることを示している。サイクルの生成物溶解フェーズ中の連続蛍光モニタリングはそのサイクル中に存在するＤＮＡの純度、同一性、量について有用な情報を提供する。

ＰＣＲ反応を拡張温度から変性温度まで過熱すると、サンプル中のＤＮＡが一本鎖に溶解する。この変性はＳＹＢＲ™グリーンＩの蛍光の急降下として観察できる。少量のＰＣＲ生成物では、溶解遷移は狭い温度範囲で発生し、この溶解範囲の中点をＴｍで表わす。ゲル電気泳動によるサイジングと同様に、溶解ピーク分析ではＤＮＡの基本的特性を測定しし増幅生成物の同定に使用できる。ゲル電気泳動とは異なり、溶解曲線分析では同じ長さでＧＣ／ＡＴ比が異なる生成物を区別できる。さらに、同じ長さで同じＧＣ含量だが、ＧＣ分布の異なる（たとえば等しく分布しているものに対して一方の末端にＧＣクランプしているもの）２種類の生成物は溶解曲線が非常に違うものになる。

ＰＣＲ生成物が溶解する温度は広範囲にわたって変化する。従来技術で公知の経験的公式を用いると、ＤＮＡの溶解温度™におけるＧＣ含量の影響はＧＣデュ

プレックス０％はＧＣデュプレックス１００％より４１℃低い温度で溶解すると

予言している。同じＧＣ含量とすると、４０塩基対プライマー・ダイマーは１００塩基対生成物より１２℃低い温度で溶解することになる。よって考えられるＰＣＲ生成物でのＴｍ範囲は少なくとも５０℃にわたる。この広い範囲のためＰＣＲ生成物を溶解曲線で区別することができる。つまり、ＰＣＲの連続蛍光モニタリングと溶解曲線分析の組み合わせでＰＣＲ生成物の同時的な増幅、検出、分別を提供する。

実施例１４

３種類の異なるＰＣＲ生成物について、ＳＹＢＲ™グリーンＩ蛍光用の光学系（ライトサイクラＬＣ２４、アイダホ・テクノロジー社製、アイダホ州アイダホ・フォールズ）を備えた２４サンプル熱サイクラに組み込まれた微量蛍光計によりＤＮＡ溶解曲線を取得した。１８０塩基対のhepatitis BB型肝炎ウィルス表面抗原遺伝子増幅のためのプライマーは5’－ＣＧＴＧＧＴＧＧＡＣ　ＴＴＣＴＣＴＣＡＡＴ－3’（配列ＩＤ no.１）及び5’－ＡＧＡＡＧＡＴＧＡＧ　ＧＣＡＴＡＧＣＡＧＣ－3’（配列ＩＤ no.２）とした。２９２塩基対前立腺特異性抗原（ＰＳＡ）遺伝子増幅のためのプライマーはは5’－ＣＴＧＴＣＣＧＴＧＡＣＧＴＧＧＡＴＴ－3’（配列ＩＤ no.７）と5’－ＡＡＧＴＣＣＴＣＣＧ　ＡＧＴＡＴＡＧＣ－3’（配列ＩＤ no.８）とした。５３６塩基対ヒトβグロブリン遺伝子増幅は実施例７と同様に行なった。ＰＣＲは実施例２に記載した通りに実施した。増幅生成物はフェノール／クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によって精製した後、セントリコン３０マイクロコンセントレータ（マサチューセッツ州ダンバースのアミコン社から入手）により反復洗浄した。テンプレート濃度は２６０ナノメートルの吸光度で決定し、１．７以上のＡ（２６０）／Ａ（２８０）比を有していた。

精製ＤＮＡ$_{50}$ｎｇを、５０ｍＭトリスｐＨ８．５、２ｍＭＭｇＣｌ$_2$、２５０μｇ／ｍｌウシ血清アルブミン、５μｌ容量で、ガラス／プラスチック複合材料試験管の開放プラスチック容器にピペット採取し、ガラス毛細管先端にサンプルがくるように低速で遠沈し、プラスチック栓で内側封止した。溶解曲線の蛍光デ

ータは、０．１～１０．０℃／秒で９５℃までの直線的温度変化中に０．２５～２．０秒にわたる信号の積分により取得した。蛍光を連続的に計測してＬａｂＶｉｅｗプログラミング環境（ナショナル・インストルメント社、テキサス州オースチン）において蛍光対温度プロットとして表示した。図３７は３種類の精製ＰＣＲ生成物の溶解曲線を示す。

図３７で３種類の生成物のＴｍは６度だけ広がっており２つの曲線は２度だけ離れている。この小さな隔たりは生成物の容易な識別を行なうには充分である。Ｔｍの長さにわたるＧＣ百分率の重要性は、もっと長い５３６塩基対βグロブリン・フラグメントよりも高温で溶解する２９２塩基対ＰＳＡ生成物で示されている。溶解曲線は平衡を確実にするため０．５℃／分のレートで得ることが多い。さらに、過熱レートが低下すると、溶解曲線はもっと低温側にシフトしてシャープになる（図３８、hepatitis Bフラグメント）。しかし、図３７の溶解曲線は０．２℃／秒（１２℃／分）の加熱レートの間に得たものであり２℃又はそれ以下のＴｍ差のある生成物を区別できる。

ＰＣＲ生成物の見掛けのＴｍもまた二重鎖特異性ＤＮＡ染料の濃度に依存している（図３９、hepatitis Bフラグメント）。染料濃度が高くなるとＤＮＡデュプレックスの安定性が向上し、ひいては観察されるＴｍが増加する。

ＳＹＢＲ™グリーンＩによる溶解曲線のモニタリングでは、好適条件はＳＹＢＲ™グリーンＩを１：７，０００～３０，０００倍希釈、加熱レート０．１～０．５℃／秒である。これらの条件では２℃だけＴｍが異なる生成物を容易に識別できる。

もっと正確な温度制御と溶解ピーク分析用ソフトウェアで数分の一度まで検出可能なＴｍの差を引き下げられる。これにより大半のＰＣＲ生成物の識別ができる。しかし全ての生成物をＴｍで識別できるわけではなく、２種類又はそれ以上の生成物の同時移動による電気泳動の結果を読み値が得ることが考えられるように、想定した範囲で溶解する生成物の幾つかが意図した生成物ではない可能性がある。しかし、想定した生成物の範囲でＤＮＡが溶解しない場合、結果論的に想

定した生成物が何も存在していないということはできる。

溶解曲線分析で利用可能な生成物識別の別の態様はもっと長いＰＣＲ生成物で見られるドメイン溶解のはっきりとしたパターンである。短い生成物（＜３００塩基対）は通常１つの遷移で溶解するが、長い生成物は複雑な、目立つ形状の溶解曲線を描く中間溶解ドメインを有することがある。これらの複雑な溶解曲線は生成物同定のための指紋として使用できる。

溶解曲線分析を用いて非特異性生成物たとえばプライマー・ダイマーなどから意図した生成物を区別することができる。プライマー・ダイマーは低温で広い範囲にわたって溶解し、特異的ＰＣＲ増幅生成物のシャープな溶解曲線とは非常に異なる。アニーリング厳密度が低い多数サイクルを実施することで得られたもっと大きなヘテロ接合性生成物は純粋ＰＣＲ生成物と比較した場合に低く広い溶解曲線を有している。

実施例１５

５３６βグロブリン遺伝子フラグメントの増幅を、実施例７と同様の１：３０，０００倍希釈したＳＹＢＲ™グリーンＩで、条件を変化させて実施した。反応Ａ（図４０）では、テンプレートを添加せず反応は９４℃０秒、６０℃０秒、７２℃１０秒で３０サイクルにわたり反復して小さい非特異性増幅生成物を作成した。Ｂでは、低厳密度で精製テンプレートの初期コピー１０の６乗個（９４℃０秒、５０℃０秒、７２℃１０秒）を５５サイクルして、ゲル電気泳動上で増幅生成物が広い範囲を示し、広い温度範囲にわたって溶解する。Ｃでは、１０の６乗個の精製テンプレート初期コピーを９４℃０秒、６０℃０秒、７２℃１０秒で３０回サイクルしており、単一の明るいバンドを示し、シャープな遷移で溶解する。温度遷移レートは０．２℃／秒だった。λファージＤＮＡ（Ｍ）のＨｉｎｄＩＩＩ消化をマーカとして使用している。

図４０は溶解曲線がＰＣＲ反応の特異性をどのように正確に反映するかを示している。シャープな、高温の溶解曲線Ｃはゲル上の単一バンドに対応する。低温で広範囲に溶解する曲線Ａはテンプレート対照なしの分析によるものでプライマ

ー・ダイマーだけを示している。Ｃでの生成物の過剰増幅は中間溶解曲線Ｂとなるが特異性生成物とは明らかに識別できる。

たとえば図３７に見られる溶解曲線は温度（Ｔ）に対する蛍光（Ｆ）の導関数を最初に取ることによってより良く定量できる。この導関数が－ｄＦ／ｄＴ対Ｔとしてプロットしてあり溶解曲線を溶解ピークに変換している。

実施例１６

実施例１４の精製hepatitis B及びβグロブリン遺伝子フラグメントを個別にまた一緒に温度変化レート０．２℃／秒で溶解し、他の条件は実施例１４で指定した通りとした（図４１）。溶解曲線（上部）からの幾らか主観的なＴｍの決定は溶解ピーク（下部）から目視で簡単に行なえる。溶解ピークより下の領域も曲線より下の面積の積分によって定量できる。基線の大きさが曲線より下の範囲として変化するものと仮定して、最初に蛍光基線を－ｄＦ／ｄＴ対Ｔプロットから減算する。次に、カーブフィッティング・パラメータとしてピークの平均、標準偏差、高さを用いてガウス曲線への非線形最小自乗法回帰により当てはめた。各々のガウス曲線より下の領域はピーク領域として取った。全ての計算はＬａｂＶｉｅｗプログラミング環境（ナショナル・インストルメント社、テキサス州オースチン）で実施した。図４１は溶解曲線から溶解ピークへの変換の一例を示す。これらの計算のためのコードが付録Ａに含めてある。

プライマー・ダイマーやその他の反応アーチファクトから特異性生成物を識別できる能力は初期コピー数が低い定量での二重鎖特異性ＤＮＡ染料の使用を改善する。比較的大きな初期テンプレート・コピー数は臭化エチジウムを用いて定量されている（ヒグチ＆ワトソン、前出）。しかし、低い初期コピー数では、プライマー・ダイマーやその他の増幅アーチファクトのバックグラウンド増幅が特異性増幅信号に干渉する。非特異性アーチファクトから特異性生成物を区別できる本発明の能力では、二重鎖特異性ＤＮＡ染料を用いて低初期テンプレート・コピー数を定量できる。これらの染料を用いる簡便性のため有利である。二重鎖特異性ＤＮＡ染料は全ての増幅で使用でき、カスタム的に蛍光標識したオリゴヌクレ

オチドは必要としない。二重鎖特異性ＤＮＡ染料による超低コピー数の定量には非常に良好な増幅特異性か又は、本発明で提供されるように非特異性増幅から所望の生成物を区別するための手段を必要とする。

実施例１７

本発明による生成物純度決定のアプローチを用いて二重鎖特異性ＤＮＡ染料蛍光のサイクルあたり１回モニタリングに基づく定量ＰＣＲを改良した。蛍光は精製βグロブリン・テンプレートの初期濃度を変化させた一連の反応について（図４２Ａ参照）生成物のポリメラーゼ拡張後に各サイクル毎１回計測した。βグロブリン・テンプレートと増幅条件は実施例７に示した通りとした。バックグラウンド蛍光以上の対数直線性増加は初期テンプレート濃度によって変化するサイクル数で始まった。反応あたり１０の６乗から１０の２乗コピーまでの５種類の反応のプロットがおよそ４サイクルだけ隔たっている。反応あたり平均１０の２乗個のコピーのサンプルは反応効率の低下を示し、初期コピー数１００未満の反応はあまり有用でない蛍光プロファイルを示した。１０及び１（平均）コピーを含む反応での蛍光プロファイルは逆の順番で増加し、陰性対照は約３０サイクル後に増幅を示した。これはプライマー・ダイマーの増幅やその他非特異性増幅生成物に由来するもので二重鎖特異性ＤＮＡ染料のサイクルあたり１回の蛍光モニタリングでは意図した生成物から識別することができない。

各サンプルについて溶解ピークを計測し（図４２Ｂ）たところ電気泳動の結果と良く相関することが分かった(図４２Ｃ)。ゼロ及び１平均初期テンプレート・コピー数を含む反応は予想される５３６塩基対のロケーションに識別可能な電気泳動バンドを作らなかった。１０及び１００初期コピー・テンプレートを含む反応は弱い電気泳動バンドを示した。これは、ゼロ及び１初期コピーを含む反応で意図した生成物範囲（９０～９２℃）でのＤＮＡ溶解なし、また１０及び１００コピーでこの温度範囲に弱いピークを示した溶解ピーク分析と良く一致している。

１０の３乗から１０の６乗初期コピーを含む反応での強い電気泳動バンドは想定した９０～９２℃範囲での大きな溶解ピークと良く相関している。

溶解ピーク積分によって求めた、全生成物に対する意図した生成物の比は１０の５乗コピーでの０．２８からゼロ初期テンプレート・コピーでの０．０００２までに広がっている。図４１Ａの各々の蛍光値は適当な比率で乗算して補正プロットを得た（図４２Ｄの「補正蛍光」で示す）。この手順は１０及び１初期テンプレート・コピーの間まで定量の有効ダイナミック・レンジを拡大した。

溶解ピークは非特異性生成物から特異性生成物を識別でき（図４０）一緒に混合された２種類の精製ＰＣＲ生成物を識別できるので、単一の試験管内で一緒に増幅された２種類の特異性生成物の識別にも有用なはずである。本発明によるＰＣＲ反応の連続モニタリングによって得られた溶解曲線は多重ＰＣＲで有用である。

実施例１８

本実施例では、ゲノムＤＮＡから２種類の遺伝子フラグメントを同時に増幅しＳＹＢＲ™グリーンＩ蛍光でモニタした。各増幅サイクルの間、異なった増幅生成物が生成物の長さ、ＧＣ比、及びその他従来技術で周知の要因に依存する溶解温度で変性する。各生成物が溶解する温度は二重鎖特異性ＤＮＡ染料であるＳＹＢＲ™ “ ” グリーンＩでモニタできる。嚢胞性線維症遺伝子からの８１塩基対フラグメントは本明細書で配列ＩＤ No.１４及び配列ＩＤ No.１５として記載したプライマーを用いて増幅し、これに併せて本明細書で配列ＩＤ No.１６及び配列ＩＤ No.１７として記載したプライマーを用いたｃ－ｅｒｂＢ－２（ＨＥＲ２／ｎｅｕ）オンコジーンの９８塩基対フラグメントを増幅した。

増幅反応は５０ｍＭトリスＨＣｌｐＨ８．３、３ｍＭＭｇＣｌ$_2$、５００μｇ／ｍｌウシ血清アルブミン、各２００μＭのｄＮＴＰ、０．５μＭ嚢胞性線維症プライマー、０．３μＭのＨＥＲ２／ｎｅｕプライマー、１：３０，０００倍希釈ＳＹＢＲ™グリーンＩ、１単位ＡｍｐｌｉＴａｑゴールドＤＮＡポリメラーゼ

（パーキン・エルマー社、カリフォルニア州フォスターシティ）、５０ｎｇのヒトゲノムＤＮＡを１０μｌに含有していた。

９５℃３０分でポリメラーゼの活性化後、サンプルは９４℃０秒（傾き＝２０

）、５５℃秒（傾き＝２０）、７０℃１０秒（傾き＝２０）で３５回サイクルした。サンプルを７０℃に冷却し、０．２℃／秒の傾斜で９４℃までの間蛍光を連続計測した。溶解曲線（図４３）は７８℃（ＣＦＴＲ）と８８℃（ｎｅｕ）で溶解する２種類の別個の生成物を明確に示した。２種類の生成物はＴｍにおいておよそ１０℃だけ異なっており容易に識別できる。

多重増幅は増幅中の内部制御が必要とされる場合に有用である。たとえば、多くの転位はブレークポイントの各々の側にプライマーを配置することによりＰＣＲで検出できる。増幅が起こらない場合、ＤＮＡが無傷で阻害剤が存在していない限り転位は存在しない。これらの可能性は同じ反応混合物で陽性対照配位を増幅することにより除外できる。このような制御増幅は同時的な増幅と検出の内部制御として最も良く行なわれる

実施例１９

本実施例では、実施例１８の手順にしたがうが９５℃３０分でのポリメラーゼ活性化後に、９４℃０秒（傾き＝２０）、５５℃０秒（傾き＝２０）、７０℃１０秒（傾き＝２０）で２０サイクル、これに続けて９４℃０秒（傾き＝１）、５５℃０秒（傾き＝２０）、７０℃２０秒（傾き＝２０）で１５サイクルにわたりサンプルをサイクルした。サイクル２６～３１では、７０℃から９４℃までの１℃／秒の各遷移中に蛍光を連続的に計測した。溶解曲線は溶解ピークに変換して表示した（図４４）。ＣＦＴＲフラグメントの増幅効率がｎｅｕフラグメントより大きく見えることに注意されたい。増幅効率は溶解ピークデータを実施例１６と同様に積分することで厳密に決定できる。

対照を参照したこの種の定量データは多くの応用を有している。たとえば、ある種のオンコジーン、たとえばＨＥＲ２／ｎｅｕは多くの腫瘍では生体内増幅し

ている。つまり、遺伝子がゲノムＤＮＡ内で、時には数倍に複製されている。しばしば腫瘍の臨床的挙動はオンコジーン複製の度合に依存する。オンコジーンと制御テンプレートの増幅により相対的コピー数の定量評価ができる。さらに別の例として、ＨＩＶ又はhepatitis ＣＣ型肝炎に感染した患者でのウィルス負荷の

定量は予後と治療の面で重要である。制御テンプレートを使用し対照と自然テンプレート両方の増幅中の増幅効率をモニタすることで初期テンプレート・コピー数の正確な定量が実現される。

相対的定量に溶解曲線を使用する本発明の特徴についてここで説明する。本発明によれば、溶解曲線のさらなる用途が定量ＰＣＲである。図４２は溶解ピークの下側部分と特異的生成物の量の間に相関があることを示した。２種類のＰＣＲ生成物の相対的定量は２種類の生成物が同様の効率で増幅された場合（又は異なる効率が既知であり補償される場合）に可能である。溶解ピーク面積の積分による（実施例１６参照）２種類の生成物の相対的定量は本発明の側面である。

実施例２０

実施例１８の嚢胞性線維症遺伝子及びＨＥＲ－２－ｎｅｕ遺伝子フラグメントを実施例２と同様に増幅精製し、１７５μｇ／ｍｌに調製した。サンプルを様々な比率（合計８μｌ）で混合しバッファ（１μｌ）とＳＹＢＲ™グリーンＩ（１μｌ）に添加した。終濃度は５０ｍＭトリスｐＨ８．３、３ｍＭＭｇＣｌ$_2$、２５０μｇ／ｍｌウシ血清アルブミン、１：３０，０００倍希釈ＳＹＢＲ™グリーンＩだった。溶解曲線は０．２℃／秒で計測し背景蛍光を減算しピークは実施例１６で説明したように積分した。結果を図４５に示す。溶解ピークの下の相対面積と２種類の生成物の相対量の間には優れた相関が見られた。

２種類のＰＣＲ生成物の相対的定量は多くの定量ＰＣＲ応用で重要である。２種類又はそれ以上の生成物の多重増幅とそれに続く溶解ピーク以下の面積の積分はこうした分野できわめて有用である。ｍＲＮＡはハウスキーピング遺伝子のｍＲＮＡ量に対して相対定量されることが多い。

相対的定量の別の重要な用途は競合的定量ＰＣＲにある。代表的には同じプライミング部位を有しているがオリジナル標的配列からの長さが異なる競合遺伝子を合成する。既知の量の競合遺伝子を未知のサンプルにスパイクし相対的定量を行なう。長さよりＴｍで標的遺伝子と異なる競合遺伝子を作ることができる。生成物の相対量は溶解ピーク下側の面積を比較することで定量できる。生成物の一方の量が分かっている場合、オリジナルの標的の量を得ることができる。溶解ピ

ーク方を用いることで未知のサンプル各々に付いて多数の試験管で増幅し反応中の様々なサイクル数で試験管を抜き取って反応の対数直線性部分を見つけ出すことによる現在使用されている方法より有意に簡単になる。２種類の生成物の相対量を決定しなければならない。通常これはｄＮＴＰの一方を放射性同位元素で標識しておきアガロースゲル電気泳動後に各バンドに含まれる標識の量を定量することで行なっている。これに比較すると、本発明によれば反応を連続的にモニタできるので増幅の対数直線性部分は簡単に同定できる。溶解ピークの積分によって相対的定量は迅速に行なうことができる。終日処理は１時間以内にまで短縮される。

前述の議論から、ＤＮＡ増幅中の蛍光もいたりングは非常に強力な分析技術であることが理解されよう。配列特異性の検出と定量が望まれる場合、共鳴エネルギー転移プローブを二重鎖特異性ＤＮＡ染料の代わりに使用できる。ハイブリダイゼーション・プローブのＴｍは単一塩基の不整合が存在する場合に約４～８℃シフトする。ハイブリダイゼーション・プローブが突然変異部位に配置された場合単一塩基の変移はプローブ溶解温度のシフトとして検出できる。

実施例２１

第Ｖ因子ライデン変移はアミノ酸基５０６（Ｒ５０６Ｑ）でグルタミン基をアルギニン基に置換する単一塩基変化（ＧからＡ）である。さらに詳しくは、Ｒ．Ｍ．バーティナら、活性タンパクＣ抵抗性の関与する血液凝固第Ｖ因子突然変異(R. M. Bertina et al., Mutation in Blood Coagulation Factor V Associated with Resistance to Activated Protein C, 369 Nature 64–67(1994))及びＪ．ヴォアベルグら、特発性静脈塞栓症と第Ｖ因子$Ａｒｇ^{506}$のシングルポイント変異の

関連性(J. Voorberg et al., Association of Idiopathic VenousThromboembolism with a Single Point-Mutation at Arg 506 of Factor V, 343Lancet 1535–36(1994))を参照されたい。どちらも本明細書で参照に含まれる。本明細書で用いられる「第Ｖ因子ライデン変異部位」は野生型のグアニン塩基が第Ｖ因子ライデン変異種ではアデニン塩基で置き換えられている第Ｖ因子遺伝子のヌクレオチド

位置を表わす。配列ＩＤ no. ９は野生型第Ｖ因子遺伝子、配列ＩＤ no. １０は第Ｖ因子ライデン遺伝子の対応する部分を示し、各々の場合で遺伝子座３１に関連ヌクレオチドがある。第Ｖ因子遺伝子の完全なヌクレオチド配列は、本発明で参照に含まれるＲ．Ｊ．ジェニーらヒト第Ｖ因子の完全なｃＤＮＡと誘導アミノ酸配列順序(R. J. Jenny et al., Complete cDNA and Derived AminoAcid Sequence of Human Factor V, 84 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA4846-50(1987))に記載されており、配列はジーンバンク遺伝子座ＨＵＭＦ１０で得ることもできる。突然変異第Ｖ因子タンパクのアミノ酸変化はこの凝固因子を分解抵抗性にし凝固及び血栓の傾向を増加させる。先天性血栓症のもっとも共通の原因として、この突然変異が臨床分子遺伝学研究室で行なわれる共通のラボテストの標的である。

第Ｖ因子ライデン変異分析の標準法はＰＣＲによる遺伝子セグメントを増幅してから、野生型配列は切断するが突然変異種は切断しない制限酵素エンドヌクレアーゼで得られた増幅生成物を消化し、ゲル電気泳動により消化された野生型と未消化の変異生成物とを識別する。（Ｒ．Ｍ．バーティナら、前出）これは定義された突然変異に付いての分析のための従来技術で周知の方法である。このような試験は、通常約４時間かかり、これにはＰＣＲ増幅（２時間）、酵素消化（１時間）、電気泳動（１時間）を含む。増幅後のステップにはサンプル試験管を開き、酵素を追加し、消化されたサンプルを電気泳動装置へ移し換えるステップが含まれる。増幅後処理は最終生成物の汚染の危険を増加し用手的操作はサンプルのラベル間違いを防ぐ注意が必要である。点突然変異を同時に増幅分析する方法ではこれらの配慮が不要になる。

同じ装置内で３０分以内に第Ｖ因子ライデン変異の増幅と分析を完了する方法は変異遺伝子座を含むヒトゲノムＤＮＡサンプルの一部を非対称的に増幅し、続けて増幅ＤＮＡの溶解曲線を採取し分析するステップを含む。ゲノムＤＮＡは従来技術で周知の方法、たとえば本明細書で参照に含めるＪ．サムブルックら、分子クローニング：検査マニュアル(J. Sambrook et al., Molecular Cloning:ALaboratory Manual(2nd ed., 1989))にしたがって調製する。望ましくは、溶解曲線を蛍光性ハイブリダイゼーション・プローブによる前述の共鳴エネルギー転移

法によって取得する。このようなアッセイではホモ接合性野生型、ホモ接合正変異種、ヘテロ接合性遺伝子型を容易に判別する。好適実施例において、オリゴヌクレオチド・プローブはフルオレセインで３’末端標識し共鳴エネルギー転移でのＣｙ５標識プライマーに近い増幅ＤＮＡとハイブリダイゼーションするように設計される。本法は定義されている突然変異に応用可能である。

プローブ・オリゴヌクレオチドは長さ約１５～４０ヌクレオチド残基が望ましい。プローブは約１０ヌクレオチド程度にまで少ない残基を含むのが良いと考えられるが、こうした短鎖オリゴヌクレオチドに考えられる欠点としては特異性の低さ、低い溶解温度、バックグラウンドの増加が挙げられる。４０残基より大きいオリゴヌクレオチドも使用できるが不必要に高価である。つまりプローブ・オリゴヌクレオチドのサイズ上の制約は機能によって課せられる制約だけである。プローブ・オリゴヌクレオチドは突然変異部位にまたがるべきだが、変異はプローブの５’－又は３’－末端ヌクレオチド残基どちらかに対応しないのが望ましい。本発明は溶解曲線に基づくものであるので、また末端での塩基対の欠如は中間部でよりも溶解性に対する影響が少ないことが知られているので、プローブは突然変異が中間部位で発生するように設計すべきである。

選択した突然変異部位の増幅のためのオリゴヌクレオチドは長さ約１５～３０残基が望ましい。好適範囲より短いプライマーも使用できるが所望する程の特性にはならない。同様に、好適範囲より長いプライマーも使用できるが、不必要に高価である。つまりＰＣＲプライマーのサイズに関する制約は機能によって課せられる制約だけである。

共鳴エネルギー転移対間の距離も本発明の正しい機能性に重要である。共鳴エネルギー転移対間の最適距離は約５ヌクレオチドである。約２から８ヌクレオチドの距離が好適だが、約１０～１５ヌクレオチドまでの距離が機能する。隣接ヌクレオチドに共鳴エネルギー転移対を有するのは共鳴エネルギー転移対間の距離がＤＮＡらせん上の配位によって影響されるため必ずしも有益ではない。

本実施例において、ＰＣＲ増幅は５０ｍＭトリスｐＨ８．３、３ｍＭＭｇＣｌ$_2$、５００μｇ／ｍｌウシ血清アルブミン、各２００μＭのｄＮＴＰ、０．５μ

ＭＣｙ５標識プライマー（配列ＩＤ no. １１）、０．２μＭ未標識対立プライマー（配列ＩＤ no.１２）、０・１μＭフルオレセイン標識プローブ(配列ＩＤ no. １３）、０．４単位Ｔａｑポリメラーゼ、５０ｎｇヒトゲノムＤＮＡを含む１０μｌ反応混合物で実施した。４種類の異なるＤＮＡサンプルを試験した：第Ｖ因子ライデン変異がホモ接合性のヒト由来のヒトゲノムＤＮＡ、ヘテロ接合性のヒト由来のヒトゲノムＤＮＡ、野生型第Ｖ因子対立遺伝子ホモ接合型のヒト由来のヒトゲノムＤＮＡ、ＤＮＡなしの陰性対照である。Ｃｙ５標識プライマー、フルオレセイン標識プローブ、突然変異部位（*印で表わす）の方向性は以下に示す通りである：

Cy5

|

5'-TAATCTGTAAGAGCAGATCC-3' （配列ＩＤ no. １１）

*

TAATCTGTAAGAGCAGATCCCTGGACAGGCGAGGAATACAGGTATT （配列ＩＤ no. ９）

ATTAGACATTCTCGTCTAGGGACCTGTCCGCTCCTTATGTCCATAA

3'-CTGTCCGCTCCTTATGTCCATAA-5' （配列ＩＤ no. １３）

|

フルオレセイン

未標識対立プライマーの配列はＴＧＴＴＡＴＣＡＣＡＣＴＧＧＴＧＣＴＡＡ（配列ＩＤ no.１２）で増幅生成物は長さ１８６塩基対だった。Ｃｙ５標識プライマーは実施例８の通りに取得した。サイクル条件は９４℃０秒（傾き＝２０）、５０℃１０秒、７２℃０秒（傾き＝１）で５０サイクル、これに続けて４５℃まで冷却し、溶解曲線について９４℃まで０．２℃／秒の傾きで連続蛍光モニタリングした。遅い温度遷移レート（０．２℃／秒―図４６）では増幅の終りに最高品質の溶解曲線が得られたが、５０℃と９４℃の間を１℃／秒で各サイクル中モニタリングしても明らかな遺伝子型同定が提供された（図４７）。溶解曲線は温

度について蛍光の負の導関数対温度（－ｄＦ／ｄＴ対Ｔ）をプロットすることにより視覚化するのがもっとも簡単である。このようなプロットでは生の蛍光データから全ての考えられる遺伝子型の容易な視覚的同定が可能である。

プライマーの３’－末端にＣｙ５標識が近付く程、共鳴エネルギー転移信号は大きくなる。しかし、３’－末端はポリメラーゼ延長のための自由３’－ハイドロキシル基を有していなければならずＣｙ５の配置が３’－末端に近すぎると（３’又は次体塩基どちらかへ）ポリメラーゼ付着と延長を阻害する。３’－フルオレセイン・プローブはできる限りプライマーに近くハイブリダイゼーション

すべきで（１～３塩基の僅かなオーバラップは許容され得る）突然変異部位はプローブ中央に近くあるべきである。ハイブリダイゼーションした蛍光物質間の５塩基の隔たりと２３ｍｅｒプローブの８番塩基での突然変異が突然変異遺伝子と野生型配列の間に８℃の溶解曲線シフトをもたらした（図４６）。

プローブ溶解による突然変異の検出は１つの標識プローブと１つの標識プライマーの代わりに２種類の標識プローブで行なうこともできる。本実施例において、一方のプローブはＣｙ５で５’に標識し他方のプローブはフルオレセインで３’に標識する。これらの蛍光プローブはどちらもアミダイトから直接合成できるので、プライマー／プローブ計のような用手的合成ステップは比つようとされない。フルオレセイン標識プローブは、突然変異部位がフルオレセイン標識プローブの中央付近にくるように設計すべきである。Ｃｙ５標識プローブの長さは変異部位にまたがるフルオレセイン標識プローブより高い温度で（＞５℃）溶解するように設計すべきである。フルオレセインからのバックグラウンドはＣｙ５からのバックグラウンドよりも問題になるので、Ｃｙ５標識プローブの濃度は望ましくはフルオレセイン標識プローブの２～５バイトすべきである。２種類のプローブは同一鎖のゲノムＤＮＡにハイブリダイゼーションするはずで共鳴エネルギー転移対は約０から５ヌクレオチド残基離れるはずである。これ以外に、突然変異部位にまたがるプローブをＣｙ５で標識し、もう一方のプローブをフルオレセインで標識しても良い。

第Ｖ因子ライデン変異の検出のために本明細書で開示した特定のプローブ及びプライマーは単に説明のためのものであり、本明細書に記載した原理及びガイドラインにしたがうことにより当業者が不当な実験なしで突然変異のための他のプローブ及びプライマーを設計することができるであろうことは理解されよう。また本発明はゲノムＤＮＡにおける単一塩基の突然変異の検出に関して記載しているが、同じ原理をｃＤＮＡの変異の検出に応用できることも又理解されよう。さらに、同じ技術を用いて、突然変異又は多形性が存在する場合に溶解温度が変化するようにハイブリダイゼーション・プローブを設計することにより挿入及び削除を検出できる。本発明はプローブが野生型に対して突然変異遺伝子にハイブリダイゼーションした場合に溶解温度に相違が出るように設計できる既知のあらゆる突然変異を検出するために使用できる。

前述の実施例ではフルオレセインとＣｙ５を共鳴エネルギー転移標識として使用したが、他の受容体たとえばＣｙ５．５などもフルオレセインとともに使用できる。

実施例２２

実施例２１の第Ｖ因子配位を前出の通りだがプライマーをＣｙ５の代わりにＣｙ５．５で標識して増幅した。Ｃｙ５．５の放射は６８３ナノメートル・ロングパス・ダイクロイックと６８３～７０３ナノメートル・バンドパス干渉フィルタを介して観察した。Ｃｙ５．５のフルオレセインに対する比はほぼサイクル３０でバックグラウンド以上に増加し非対称増幅の５０サイクルでおよそ比率が２倍になった。野生型ＤＮＡで増幅した場合、プローブＴｍは溶解ピークで判定すると６５～６６℃だった。

単一塩基突然変異を検出する別の実施例を掲載する。

実施例２３

アラニンをバリン残基に変換し易熱性酵素が得られるメチレンテトラハイドロ葉酸（ＭＴＨＦＲ）レダクターゼ遺伝子（$C_{677}T$）の共通点突然変異が存在する。この突然変異はＭＴＨＦＲ活性を減少し、従来技術で公知の通り若年性血管障害や血栓症の独立した危険因子であるとされてきたホモシステイン血漿レベル

を増加させることがある。プライマーの一方をＣｙ５で標識した（ＴＧＡＡＧＧＡＧＡＡＧＧＴＧＴＣＴ*ＧＣＧＧＧＡ）（配列ＩＤ no.２５）。ここでT*はＣｙ５に結合した改変Ｔ残基を表わす（合成と精製については実施例９を参照）。プローブ配列はフルオレセイン－ＣＣＴＣＧＧＣＴＡＡＡＴＡＧＴＡＧＴＧＣＧＴＣＧＡ（配列ＩＤ no.２６）また他方のプライマーはＡＧＧＡＣＧＧＴＧＣＧＧＴＧＡＧＡＧＴＧ（配列ＩＤ no.２７）だった。ＭＴＨＦＲ遺伝子の１９８塩基対フラグメントを、１０μｌあたり５０ｍＭトリスｐＨ８．３、２ｍＭＭｇＣｌ$_2$、５００μｇ／ｍｌウシ血清アルブミン、各２００μＭのｄＮＴＰ、０．５μＭのＣｙ５標識プライマー、０．１μＭ対立プライマー、０．１μＭフルオレセイン標識プローブ、０．４単位Ｔａｑポリメラーゼ、でヒトゲノムＤＮＡ$_{50}$ｎｇから増幅した。各サイクルは長さ３０秒で９４℃での変性に続けて２０秒６０℃での組み合せアニーリング／拡張ステップから構成された。６０サイクル後、次のように溶解曲線を測定した：０．５℃／秒で５０～６５℃、０．１℃／秒で６５～７５℃、０．５℃／秒で７５～９４℃まで加熱した。基線減算と溶解ピークへの変換後に、全ての考えられる遺伝子型が容易に識別された（図４８）。

ハイブリダイゼーション・プローブの識別力を多重又は競合ＰＣＲの大きな利点にも使用した。たとえば、単一の中間部塩基変化を伴うように人工テンプレートを設計しハイブリダイゼーション・プローブは実施例２１及び２３のように基線変化をカバーするように設計する。競合遺伝子及び天然テンプレートの相対的増幅は実施例１６のように溶解ピークを測定積分することで決定される。これ以外に、異なる温度で異なる標的から順番に溶解する多重検出プローブを使用する場合、同じ分析によって相対的定量が実現される。一般に、二重鎖特異性ＤＮＡ染料について前述した全ての定量技術をハイブリダイゼーション・プローブによる配列特異性にすることができる。

生成物アニーリング動態による絶対生成物濃度

生成物濃度の決定はまた本発明を用いると有利に実施される。二重鎖ＤＮＡ形成の連続モニタリングによりアニーリング動態による増幅の全てのサイクルでの

ＤＮＡ定量ができる。サンプル温度を変性温度から急速に低下させ、もっと低いがプライマーのアニーリングを防止するのには未だ充分に高い温度で一定に維持する（図２）。生成物アニーリング速度は秒単位動態にしたがう（本明細書で参照に含めるＢ．ヤング＆Ｍ．アンダーソン、溶液ハイブリダイゼーションの定量分析(B. Young & M. Anderson, Quantitative analysis of solution hybridization, In:Nucleic Acid Hybridization:A Practical Approach 47-71, (B. Hames, S.

Higgins eds.,1985))参照）。何らかの任意のＰＣＲ生成物と温度について、二次速度定数を測定できる。速度定数が分かると、未知のＤＮＡ濃度は実験的アニーリング・データから求めることができる。冷却は瞬間的になることはなく、一定温度に到達する前に何らかのアニーリングが発生する。急冷は速度定数とＤＮＡ濃度決定に利用できるデータ量を最大化する。本技術は純粋なＰＣＲ生成物を要求するが、これは本発明を用いる温度サイクル中にも得られる溶解曲線によって保証できる。本発明によるこの定量法はサンプル間のあらゆる信号強度変化とは有利にも無関係である。

実施例２４

βグロブリン遺伝子の５３６塩基対フラグメントをヒトゲノムＤＮＡ（実施例７）から増幅して精製（実施例２参照）した。異なる量の精製ＤＮＡを５μｌの５０ｍＭトリスｐＨ８．３、３ｍＭの$MgCl_2$中の１：３０，０００倍希釈ＳＹＢＲ™グリーンＩに混和した。サンプルは９４℃で変性させた後８５℃まで急冷した。５２０～５５０ナノメートルの蛍光を時間経過に併せて８５℃でモニタした。異なる濃度のＤＮＡを調べた時、アニーリング曲線の形状はＤＮＡ濃度に特徴的だった（図４９参照）。任意のＰＣＲ生成物と温度で、二次速度定数を決定できる。図５０は５μｌ中の５３６塩基対フラグメント１００ｎｇについて８５℃での二次アニーリング速度定数の決定を示す。図５０に図示した二次速度式を用い、曲線はF_{max}、F_{min}、t_0及びｋを浮動パラメータとして非線形最小自乗法か域により適合させた。この種の曲線適合のための分析プログラムは従来技術で周知である（たとえば、カリフォルニア州モントレーのデルタポイント社製

ＤｅｌｔａＧｒａｐｈのユーザ定義曲線適合）。速度定数が分かると、未知のＤＮＡ濃度は実験的アニーリング・データから求めることができる。

速度定数（ｋ）を定義すると、未知のサンプルについてＤＮＡ濃度を決定できる。未知のサンプルの蛍光対時間曲線を非線形最小自乗法回帰式で、望ましくはリアルタイムでの温度サイクル中に（たとえば、ＬａｂＶｉｅｗプログラミング環境（ナショナル・インストルメント社、テキサス州オースチン）において非線形Ｌｅｖｅｎｂｅｒｇ－Ｍａｒｑｕａｒｄｔ法と説明されている方法を用いることで）適合させる。この適合では、F_{max}、F_{min}、t_0、（ＤＮＡ）は浮動パラメータ、またｋは定数である。

ある種の蛍光染料は濃度依存的にアニーリングに悪影響することから、異なる標準ＤＮＡ濃度での速度定数を決定することによって、生成物アニーリングについての二次動態を調べる。関連性を定義し適合のための別の式も必要に応じて組み込む。

また本発明の範囲内にはプローブ・アニーリング速度を用いて生成物濃度を決定することが含まれる。蛍光共鳴エネルギー転移の速度はプライマー・アニーリング温度より高いプローブ・アニーリング温度まで急降下した後の時間経過にしたがう（図２）。標識プライマーと１種類の標識プローブによる増幅の場合、アニーリング速度（及び蛍光の発生）は２次である。２種類の標識プローブを使用する場合、蛍光発生速度は３次である。これら２種類の構成を図１８に図示してある。プローブの濃度が生成物濃度より大幅に高い場合、可能性を記述するのには疑似一次式及び疑似二次式で充分である。これらの異なる条件での近似速度式は従来技術で公知となっている（Ｂ．ヤング＆Ｍ．アンダーソン、前掲書）。本発明の目的では、実験的に調べられており必要な場合には補正される近似速度式を従来技術で示唆していることで充分である。

プローブ・アニーリング速度を用いて生成物濃度を決定する場合、考えられる干渉作用としては生成物のアニーリング（分岐移動によるプローブの移動）とプローブを介したプライマーのアニーリング及び拡張が含まれる。後者はプローブ

のＴｍがプライマーのＴｍより高くプローブのアニーリング温度がプライマー・アニーリングを最小限に押えるように選択されている場合には細小になる。図１３は拡張が起こった場合でも蛍光が約２０秒にわたり時間とともに増加することを示している。この期間中、蛍光の増加は生成物濃度に依存する。

プローブアニーリング速度は生成物アニーリングによって生成物濃度を決定する前述の方法と同様に生成物濃度を決定するために使用される。ステップを要約

すると次のようになる：（１）系の適当な速度平衡を選択する、（２）既知のＤＮＡ標準を測定して速度定数を決定する、（３）異なる濃度からも止めた異なる速度定数を比較することで速度平衡の変化を調べる、（４）速度定数を用いて未知試料のＤＮＡ濃度をプローブ・アニーリング・データから決定する。

温度サイクル制御のための蛍光フィードバック。エンドポイント分析やサイクル毎分析とは対照的に、本発明では各温度サイクル全体を通しての蛍光もモニタできる。連続蛍光モニタリングは温度サイクル・パラメータの制御に使用できる。本発明はリアルタイム制御と増幅最適化のために蛍光フィードバックを使用する。二重鎖特異性ＤＮＡ染料又は蛍光標識オリゴヌクレオチド・プローブを含むＰＣＲサンプルの連続蛍光モニタリングは、個別の増幅サイクル中のハイブリダイゼーション及び溶解をモニタするために使用できる。この情報を温度サイクル装置内部の温度制御アルゴリズムで使用して熱サイクル条件を改善しカスタマイズすることができる。従来のＰＣＲは増幅前に全てのサイクル・パラメータをプログラミングして実施している。連続モニタリングでは、アニーリング、拡張、変性の連続観察に基づいて、熱サイクル条件の決定を増幅中に行なうことができる。ハイブリダイゼーション情報を用いて温度サイクルを制御することで考えられる利益としては：

１．各サイクルでＰＣＲ生成物の完全な変性を保証でき、同時に

ａ．過剰に高い変性温度への暴露を最小限に抑さえる、つまり増幅生成物及びポリメラーゼの熱による損傷を回避できる。生成物が変性温度に暴露される時間を制限するのは長い生成物の増幅でとくに有用である。

ｂ．変性温度を最小限に抑さえることにより反応特異性が増加する。これは意

図している増幅生成物よりＴｍが高い生成物に対抗して選択する。

２．各サイクルでプライマー・アニーリングに充分な時間を保証することによって増幅効率を最大にすることができ、同時に

ａ．ある程度の効率でプライマー・アニーリングに達するのに必要とされる以上に長引かせないことにより増幅に必要な時間量を最小限に抑さえる。

ｂ．アニーリング温度での時間を最小限に抑さえることにより反応特異性を拡大する。

３．各サイクルの生成物拡張に充分な時間を保証することにより増幅効率を最大にすることができ、同時に

ａ．生成物拡張を完了するのに必要とされる以上に長引かせないことにより増幅に必要とされる時間量を最小限に抑さえる。

ｂ．意図した増幅生成物より長い生成物に対抗して選択することにより反応特異性を拡大する。

４．得られた蛍光レベル又は増幅の現在の効率に依存した熱サイクル変化を開始する。たとえば、過剰増幅及び非特異性反応生成物は効率がある程度のレベルにまで落ちた時点で熱サイクルを終了することによって最小限に抑さえることができる。別の例として、蛍光が検出可能になった時点で溶解曲線取得のためにゆっくりした温度傾斜を開始するように温度サイクルを変更することができる。これはゆっくりした温度傾斜を初期サイクルで使用する必要がないので時間を節約できる。本発明の継続的実施でその他の望ましい変化が明らかになるであろう。

制御は蛍光データからの反応パラメータ推定に基づいている。オリジナルの蛍光データは時間に対する蛍光の変化として測定したか（変性、アニーリング、拡張の温度特異性速度）、温度に対する蛍光の変化として測定したか（生成物又はプローブＴｍ）、又は増幅範囲の変化として測定したか（増幅収量と効率）のいずれかである。これらの速度、Ｔｍとその一次及び二次導関数を使用して変性温度及び時間、プライマー・アニーリング温度及び時間、プローブ・アニーリング温度及び時間、酵素拡張温度及び時間、サイクル数を含む反応の最適パラメータを決定する。

二重鎖特異性ＤＮＡ染料は変性の制御、拡張の制御、及びある程度の増幅レベル又は効率で熱サイクル変化を開始するために使用する。共鳴エネルギー転移染料は以下の実施例の後で説明するようにアニーリングの制御に使用する。

実施例２５

市販の蛍光モニタリング熱サイクラ（ライトサイクラＬＣ２４、アイダホ・テクノロジー社製、アイダホ州アイダホ・フォールズ）を変更してソフトウェアが温度／時間セットポイントでプログラムされず、蛍光値を測定してからこれらの値を熱サイクラ制御に使用するようにした。

機能ブロック図に図示してあるように（図５１）、ランタイム・プログラムはシリアル及びＤＡＱボード・インタフェース経由でライトサイクラと通信する。これによって温度又は蛍光データのいずれかへの高レベルのアクセスが可能になり、いずれかを温度制御用にボード・レベル・ソフトウェアで使用できる。しかし、装置の本実施例において、制御装置・ハードウェア・レベルでは温度データだけをデジタル形状に変換している。蛍光データはアナログ形状のままデジタル測定ボード・インタフェース経由で送出され、ランタイム・プログラムによって分析され、シリアル・インタフェース経由でボード・レベル・ソフトウェアに送り返される。

生成物溶解制御：

意図したＰＣＲ生成物についての溶解ピークを測定し、基線レベル蛍光は生成物が完全に溶解した温度で反応カクテルを含むサンプルで測定した。

次に反応の各サイクルではこの蛍光値を目標として使用した。生成物変性へのアプローチは２段階で行ない蛍光値を遠隔計算機へ分析のために送信し値に到達したことの指示が返される要件によるタイムラグを克服した。各生成物の溶解ステップでは、蛍光が中間値に達するまで温度を増加し、次いで加熱出力を低減しておよそ３℃／秒の温度傾斜速度とすることで、蛍光を分析する時間と生成物変性が発生したことを熱サイクラに通知する時間を計算機に与えるようにした。

得られた温度／時間プロット（図５２）は増幅生成物の濃度が上昇するとサイクル２０以降で溶解温度における特徴的増加を示している。生成物Ｔｍは生成物

濃度の関数である。

生成物アニーリング／拡張：

アニーリング／拡張を組み合せた温度での延長維持中に蛍光をモニタし、この情報を使用して充分だが過剰にならない時間が生成物拡張に与えられることを保証するようにした。蛍光は１０秒間隔でモニタし、蛍光が設定可能な比率（代表的には１．００～１．０５）以上で増加した場合にはアニーリング／拡張ステップが継続された。それ以外の場合には次の生成物溶解ステップを開始した。１０秒の間隔はアニーリング／拡張温度に最小限２０秒の時間を与えられるように選択した。

得られた蛍光／時間プロット（図５２）は増幅生成物の濃度が増加するとアニーリング／拡張組み合せ温度でのドエル時間における特徴的増加を示している。プライマー濃度とポリメラーゼが限界になると各サイクルで生成物拡張を完了するのにはさらに多くの時間が必要とされる。

増幅プラトー：

各アニーリング／拡張ステップの終りで、蛍光値を計測して格納した。この値が最低のエンドサイクル蛍光値の１．２倍に増加してからユーザ設定可能な比率（代表的には１．００～１．０５）未満で増加が停止した時点で、熱サイクルを終了した。これに代わり、生成物Ｔｍによるゆっくりした０．１～０．２℃／秒の温度傾斜を入力してサンプル蛍光を連続モニタすることによりようか委曲栓塞呈ステップを開始した。

得られた蛍光／時間プロット（図５２）では２５サイクルの増幅後にサイクル毎蛍光比の増加が１．００未満に落ち反応が終了したことを示している。

本発明の１つの実施例において、増幅プラトー検出を用いて多重サンプル・ランでの各サンプルについて各サンプルに最適な温度で高解像度溶解曲線を採取する。サンプルが増幅プラトーに達すると、そのサンプルについて溶解曲線を取得し、次いで、別の反応が増幅プラトーに達するまで通常の温度サイクルを再開する。

拡張から区別されるアニーリングのリアルタイム・モニタリング及び制御も本

発明により提供される。プライマーの一方がＣｙ５で３’末端標識してある場合には、拡張は発生し得ない。しかし、標識プライマー（１～１０％）が未標識プライマー（９０～９９％）と混合されている場合、増幅効率は僅かに減少することになるが、アニーリングは二重鎖特異性ＤＮＡ染料からＣｙ５への蛍光エネルギー転位として観察可能である。Ｔｍが最低のプライマー（従来技術で周知のように最も近い隣接熱動力学により決定される）はＣｙ５で標識しＳＹＢＲ™グリーンＩは二重鎖特異性ＤＮＡ染料として含まれる。これ以外に、等価の相補オリゴヌクレオチドによりプライマー・アニーリングを間接的にモニタすることができる。長さとＴｍが最低の溶解プライマーと同じＯｎは増幅配列に対して相補性を持たないように設計される。このオリゴヌクレオチドはＣｙ５で５’標識しこれの補体はフルオレセイン又は何らかの他の共鳴エネルギー転移対で３’標識する。これらのオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは共鳴エネルギー転移が後続する。一方のプローブの濃度は最低のＴｍのプライマーの濃度と同じにし、他方のプローブの濃度はこれより大幅に低くして生成物にアニーリングするプライマーの疑似一次動態を近似する疑似一次動態を得るようにする。アニーリングの効率をモニタしこれらの方法の１つによるアニーリング温度及び時間の制御に使用する。

温度と時間のセットポイントを蛍光フィードバック制御で完全に置き換えることも本発明の範囲に含まれる。たとえば、３種類のサンプルがフィードバック機能のある蛍光温度サイクラに配置される。サンプルは、

１．増幅生成物とＳＹＢＲ™グリーンＩを含む無反応サンプル。

２．Ｔｍが最低のプライマーと等しいＴｍを有し前述の濃度の相補的に蛍光標識したプライマーを含む無反応サンプル。

３．増幅すべきサンプルとＳＹＢＲ™グリーンＩ。

増幅の各サイクルで、生成物の変性は温度が増加するのに併せてサンプル１をモニタすることで保証される。溶解曲線はリアルタイムで求まりサンプルが変性した時点で、アニーリング・ステップへの移行が開始される。プライマー・アニーリングはサンプル２の２種類の相補的プライマーのハイブリダイゼーションに

より間接的にモニタされる。プライマーの一方はフルオレセインで３’標識され他方のプライマーはＣｙ５又は同様の染料で５’標識される。サンプル２が６７

０／５４０ナノメートルでの蛍光比の増加によって表わされるプライマー・ハイブリダイゼーションを示すまで温度を下げる。この比は、蛍光対がハイブリダイゼーションにより接近する時に蛍光体間の共鳴エネルギー転移により増加する。生成物拡張に続けて実施例２５に示したように１つまたはそれ以上の実際のサンプルの蛍光をモニタリングする。

概要

前述の議論から、ハイブリダイゼーションをモニタするためのＤＮＡ増幅中の連続蛍光モニタリングがきわめて強力な分析技術であることが理解されよう。本明細書に記載した方法を使用し存在する初期テンプレート・コピー数に依存すると生成物の同定及び定量は温度サイクルの開始後５乃至２０分で実現できる。本発明は従来技術においてこれまで利用できなかった幾つかの利点を実現する。たとえば、本発明は生成物純度、多重ＰＣＲ又は競合的ＰＣＲによる相対的定量、アニーリング動態による絶対生成物定量をモニタするための単色蛍光法と蛍光体サイクル数プロットによる初期テンプレート定量法の改良とを提供するものである。本発明はまた、配列変化検出、多重ＰＣＲ又は競合的ＰＣＲによる相対的定量、プローブ・アニーリング動態による生成物定量、蛍光体サイクル数プロットによる初期テンプレート定量のための２色配列特異的方法も提供する。

以下の表はＰＣＲの連続モニタリングに有用な二重鎖特異性ＤＮＡ染料、水解プローブ、ハイブリダイゼーション・プローブを比較したものである。二重鎖特異性ＤＮＡ染料の蛍光はＤＮＡの鎖状態に依存する。２重標識水解プローブはプローブが水解される時に無傷の供与体蛍光が増加する一方で消光する。ハイブリダイゼーション・プローブはハイブリダイゼーションが２つの蛍光物質を互いに近付ける場合共鳴エネルギー転移の増加に依存する。

ＰＣＲの連続モニタのための蛍光プローブの概要

蛍光プローブ

ハイブリダイゼーション	二重鎖ＤＮＡ染料	水解	
メカニズム	鎖状態	消光	転移
プローブ合成	不必要	困難	簡単
特異性	生成物Ｔｍ	配列	配列
溶解分析	Ｙｅｓ	Ｎｏ	Ｙｅｓ
多色分析	Ｎｏ	Ｙｅｓ	Ｙｅｓ

本発明によれば、時間、温度、蛍光を毎秒１～１０回取得し生成物および／またはプローブ・ハイブリダイゼーションの詳細を温度サイクル中に観察する。二重鎖特異性ＤＮＡ染料により温度に対する生成物のハイブリダイゼーションを用いて溶解曲線で生成物を同定する。さらに、相対的生成物定量はＴｍが異なる２種類又はそれ以上の異なる生成物の多重増幅により実現される。さらに、競合的ＰＣＲは２種類又はそれ以上の生成物が異なるＴｍを有するように共通プライマーに対する中間部配列を変更することで行なわれる。絶対生成物定量は変性した生成物を急冷しアニーリング動態を観察することで得られる。蛍光体サイクル数のプロットによる初期テンプレート定量の感度は生成物溶解曲線の分析によって増加し非特異性増幅及びカーブフィッティング・アルゴリズム制御を行なう。最後に、変性条件、延長時間、及び生成物終了の制御のための即時的蛍光フィードバックは生成物の鎖状態を二重鎖特異性ＤＮＡ染料によりモニタすることで得られる。

温度サイクル中の蛍光でプローブ・ハイブリダイゼーションをモニタする能力は強力なツールである。本発明はＰＣＲ中の配列特異性検出及び定量でプローブ・ハイブリダイゼーション（水解ではない）に依存する２色蛍光法を提供する。ハイブリダイゼーション・プローブのアニーリング動態及び溶解は蛍光物質間の

エクソヌクレアーゼ水解に頼るプローブでは得られない情報を提供する。配列特異性プローブのハイブリダイゼーションの連続モニタリングは温度変化につれて共鳴エネルギー転移へ続く。プローブの溶解は配列と生成物への相補性によって

決定される特性温度で発生する。本発明による２種類のスキーム（１）２種類の隣接ハイブリダイゼーション・プローブ、及び（２）標識プライマーを取り込む一本鎖ＰＣＲ生成物にハイブリダイゼーションする１種類の標識プローブを詳解した。配列特異性プローブの溶解温度はＰＣＲ中の生成物を同定し識別できる。ＤＮＡ多形性又は単一塩基突然変異を含む突然変異はプローブのＴｍシフトにより検出される。さらに、相対的生成物定量は各々の生成物から異なる温度で溶解する１種類又はそれ以上のプローブを用いて少なくとも２種類の生成物の多重増幅により実現される。さらに、競合ＰＣＲは１種類又はそれ以上のプローブが基ゅ号遺伝子及び自然のテンプレートに異なるＴｍでハイブリダイゼーションするようにプライマーに対する中間部配列を改変することにより実施される。これ以外にも相対又は競合ＰＣＲはプローブにことなる蛍光物質たとえばＣｙ５やＣｙ５・５などで標識した多色分析によって行なわれる。絶対生成物濃度はプローブ・アニーリング動態の分析により求められる。初期テンプレート・コピー数はカーブフィッティング・アルゴリズムにより蛍光体サイクル数のプロットから求められる。

１回のＰＣＲ反応で多重分析を所望する場合、識別可能な放射スペクトルを有する異なった蛍光標識を使用して複数生成物を同定するのが共通の技術である。分析は利用できる蛍光物質の限られた数と利用できるこれらの蛍光物質の放射スペクトルがオーバラップしていることで複雑になる（Ｈ．Ｍ．シャピロら、前出）。溶解曲線で生成物又はプローブ・ハイブリダイゼーションの分析は多数ＰＣＲ生成物を識別する別の方法である。温度サイクル中にハイブリダイゼーションを追跡することにより、多数生成物を識別するのに必要とされるプローブ個数および／またはスペクトルの色を最小限に抑さえることができる。本発明はその精神又は基本的特徴から逸脱することなくその他の特定の態様で実現することもできる。詳述した実施例はすべての点で図示を目的とするのみであって制限的な意味合い

に見なすべきものではない。したがって本発明の範囲は前述の説明によってではなく後述の請求項によって示される。請求項の等価物の意味及び範囲内に納まる

全ての変化は本発明の範囲内に包含されるべきものである。

溶解曲線及びその他の分析を実行するためのプログラミング・コードを以下のページに掲載する。

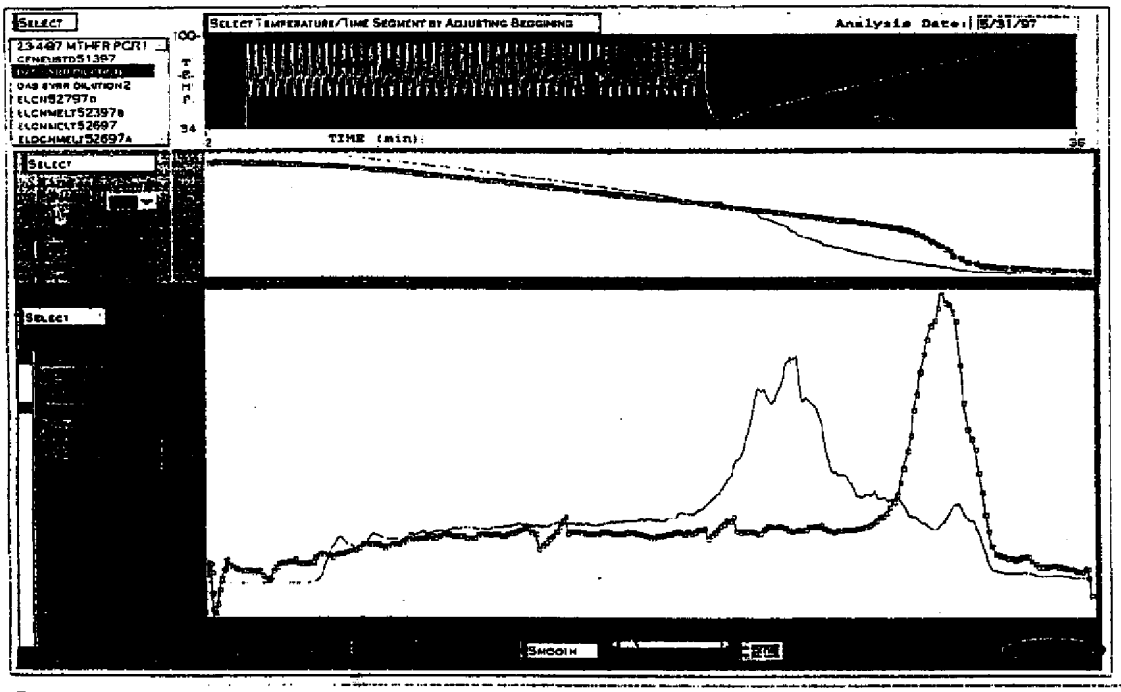
PAGE 1

CTWMELT1 1.VI
LAST MODIFIED ON 6/2/97 AT 7:28 PM
PRINTED ON 6/2/97 AT 7:39 PM

CONNECTOR PANE

CTWMELT1 1.VI

FRONT PANEL



CONTROLS AND INDICATORS

- SMOOTH
- SELECT FILE
- S OR C
- STOP
- COLOR PREFERENCES

PAGE 2 

CTWMELT11.VI
LAST MODIFIED ON 6/2/97 AT 7:28 PM
PRINTED ON 6/2/97 AT 7:39 PM

U32

DBL

TF F

U8

I32 SLOPE METHOD

TF SAMPLES
CYCLES

U8 SAMPLE #

[2-D] -DF/DT
VS T

[2-D] F VS T

U32 COLOR DISPLAY

U32

[2-D] SELECT TEMPERATURE/TIME SEGMENT BY ADJUSTING BEGINNING AND ENDING CURSORS

abc

abc ANALYSIS DATE:

abc SELECT FILE

abc TEMP/TIME

abc FLUOR

abc SAMPLES/CYCLES

abc SMOOTHING

U16 POINTS

U16 POINTS

U16 FLO FILE

U16 TEMP FILE

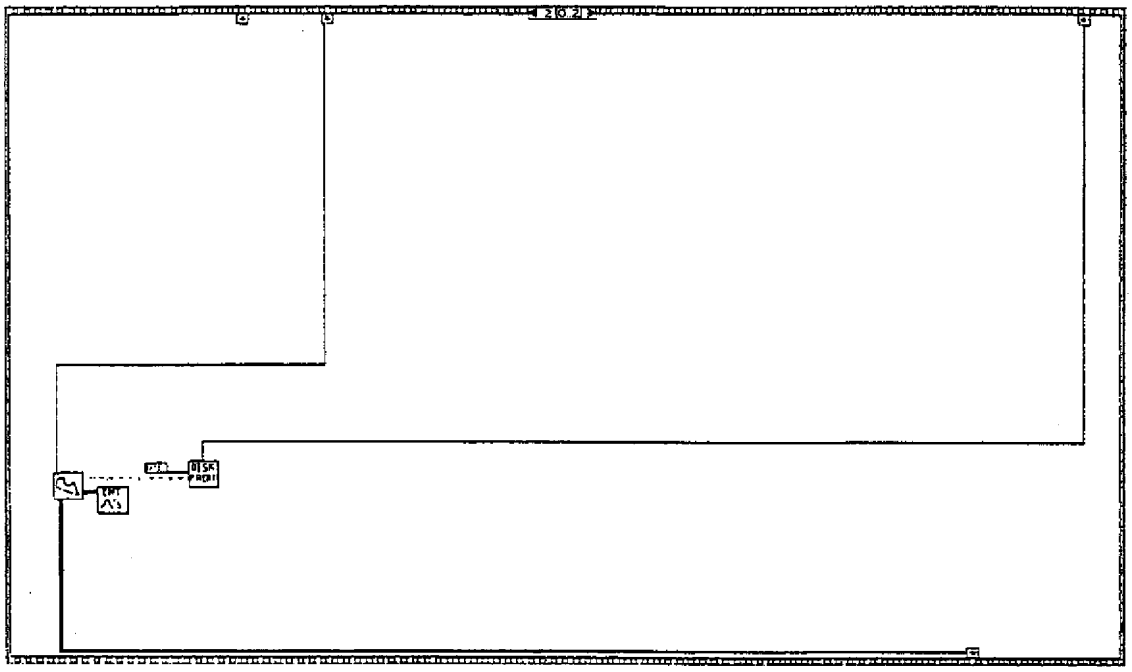
U8 CYCLES

abc

abc

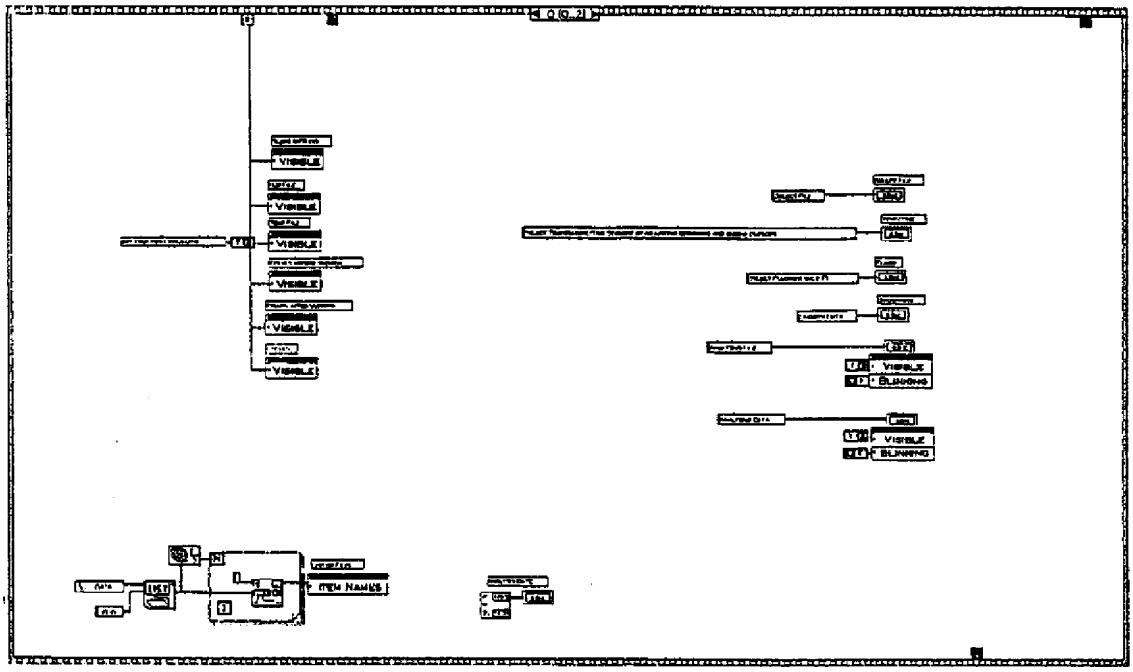
CTWMELT11.VI
LAST MODIFIED ON 6/2/97 AT 7:28 PM
PRINTED ON 6/2/97 AT 7:39 PM

BLOCK DIAGRAM

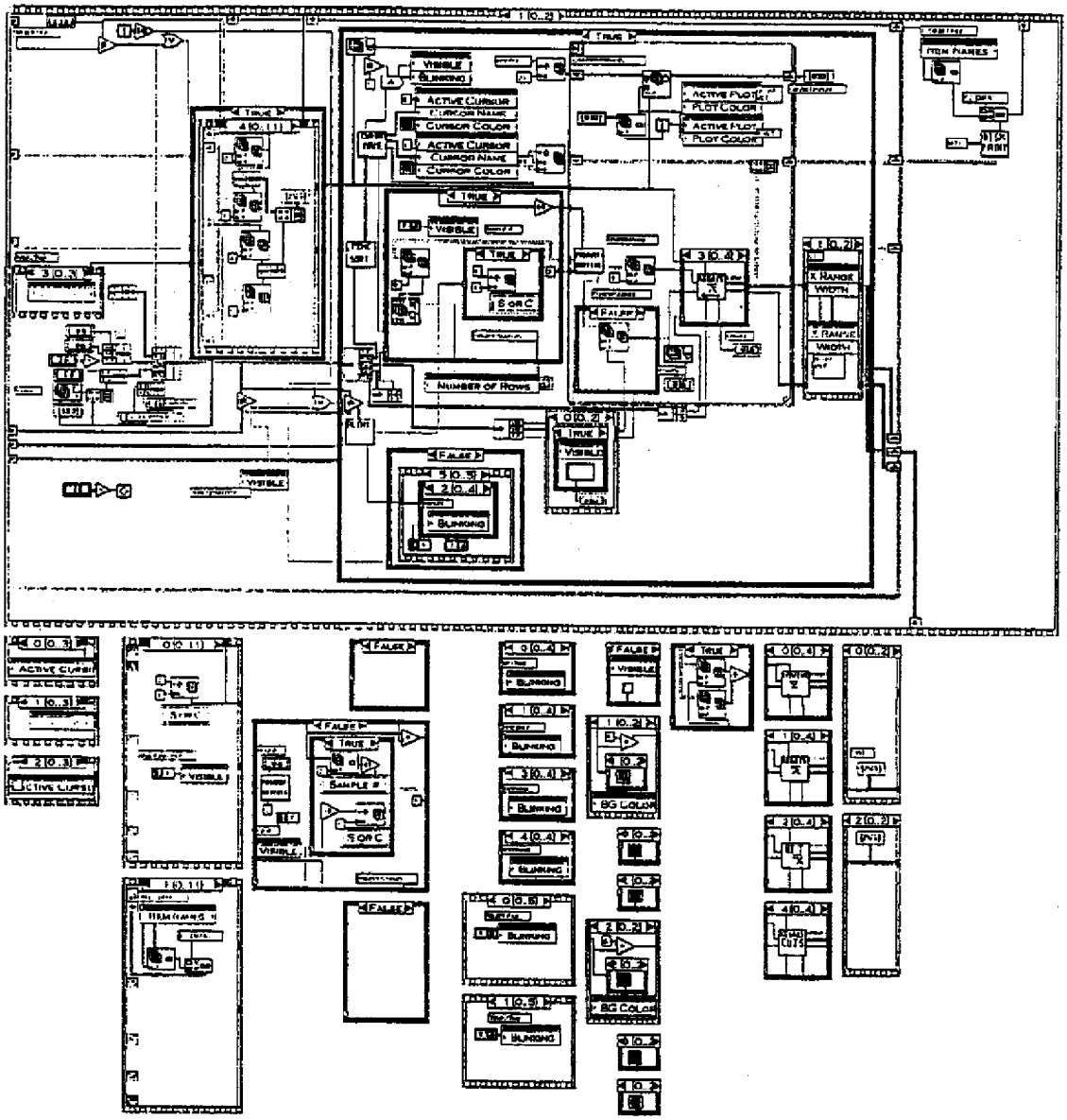


PAGE 4

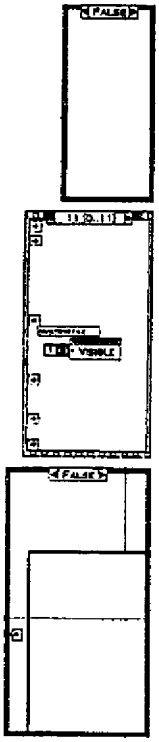
CTWMELT11.VI
LAST MODIFIED ON 6/2/97 AT 7:28 PM
PRINTED ON 6/2/97 AT 7:39 PM



CTWMELT11.VI
LAST MODIFIED ON 6/2/97 AT 7:28 PM
PRINTED ON 6/2/97 AT 7:39 PM

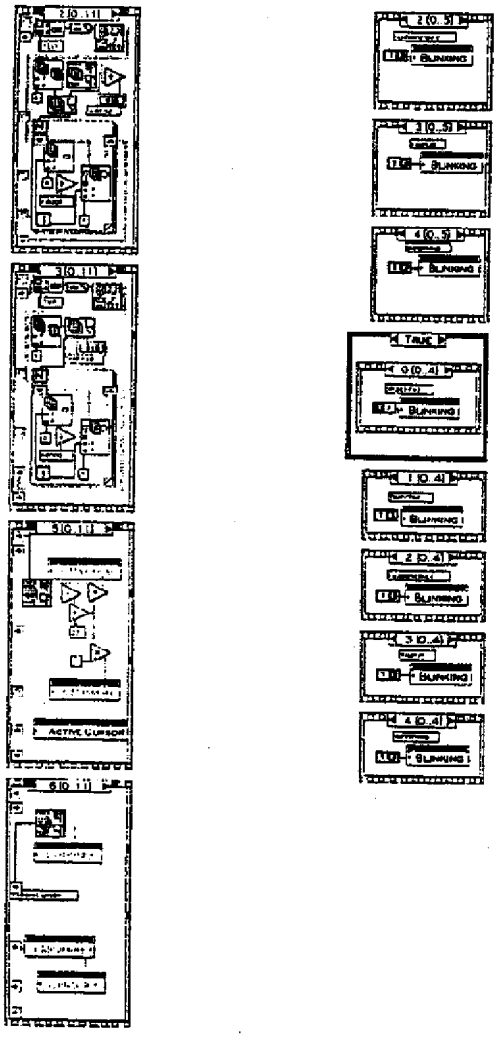


CTWMELT11.VI
LAST MODIFIED ON 6/2/97 AT 7:28 PM
PRINTED ON 6/2/97 AT 7:39 PM

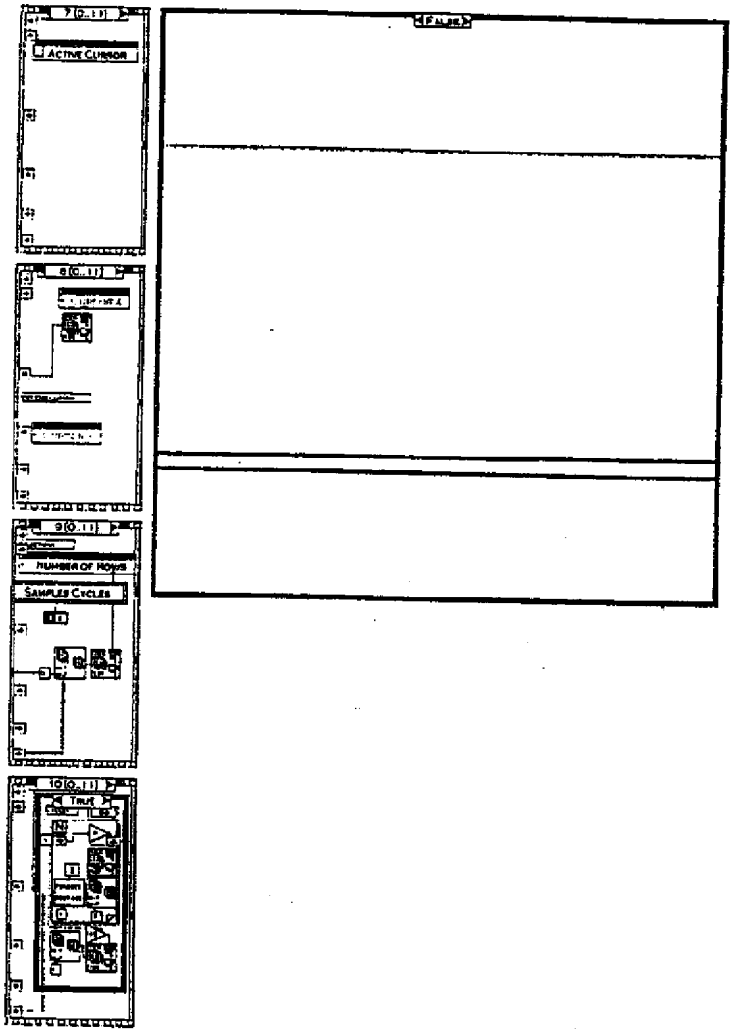


POSITION IN HIERARCHY

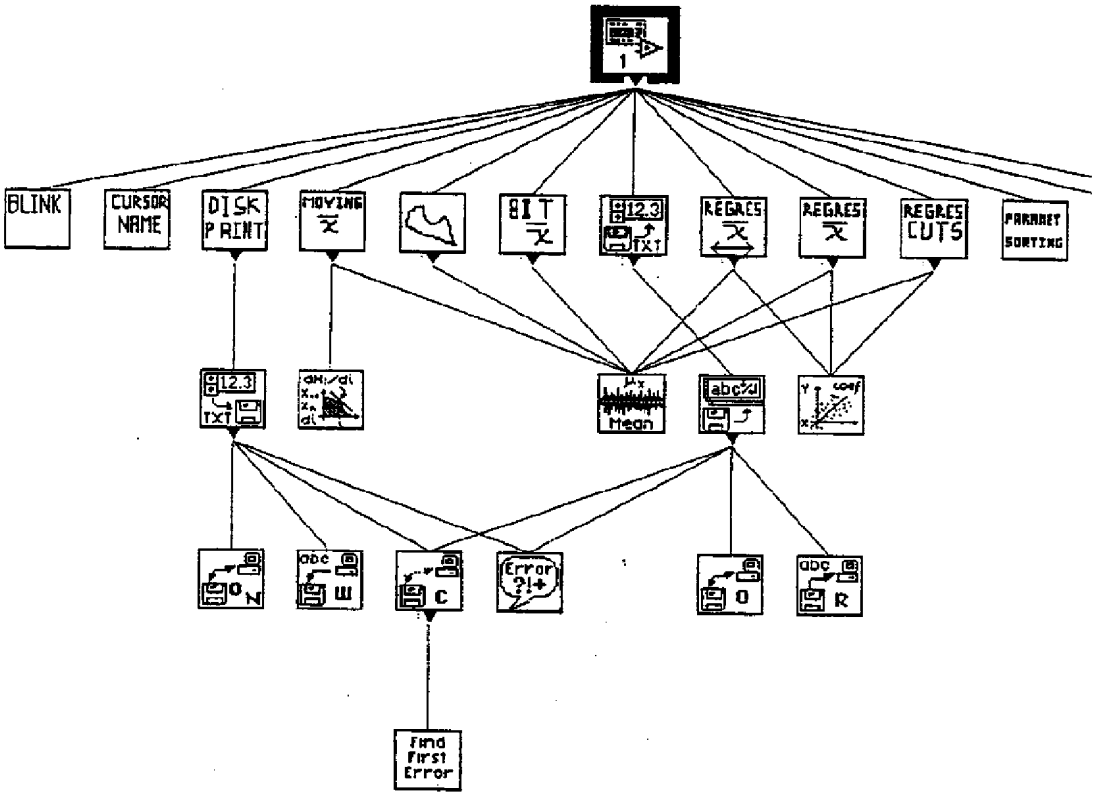
CTWMELT11.VI
LAST MODIFIED ON 6/2/97 AT 7:28 PM
PRINTED ON 6/2/97 AT 7:39 PM



CTWMELT11.VI
LAST MODIFIED ON 6/2/97 AT 7:28 PM
PRINTED ON 6/2/97 AT 7:39 PM



CTWMELT1 1.VI
LAST MODIFIED ON 6/2/97 AT 7:28 PM
PRINTED ON 6/2/97 AT 7:39 PM

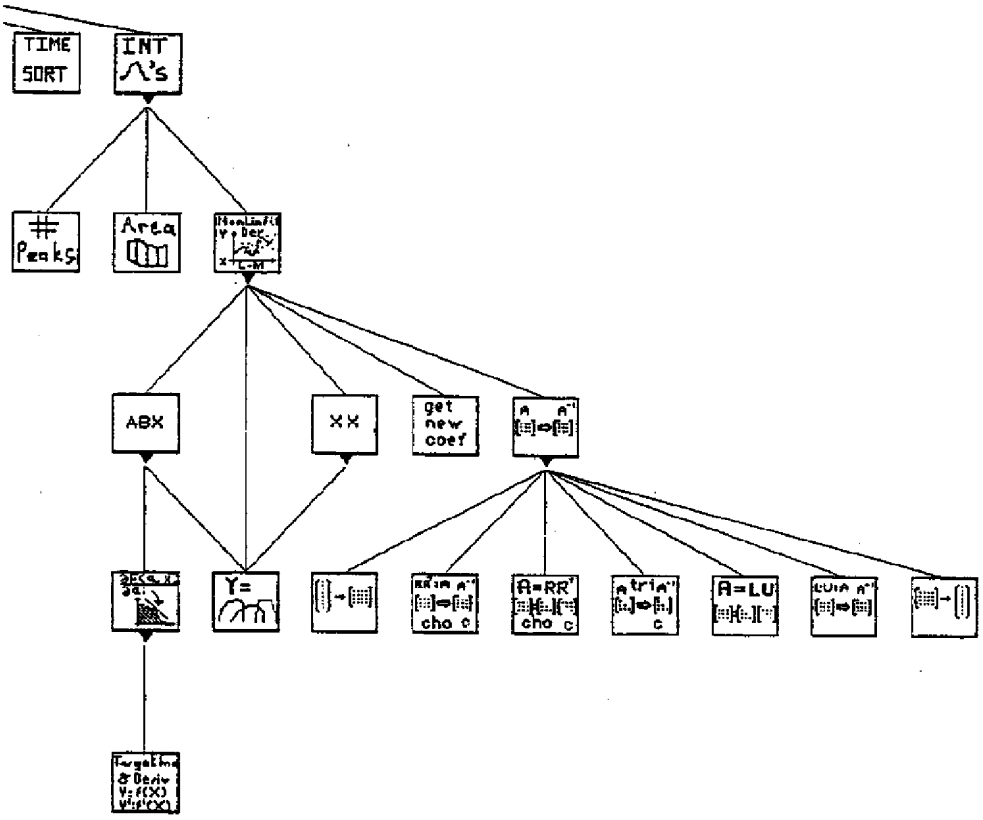


LIST OF SUBVIS

BLINK — BLINCK UPDATES.VI
C:\DATA\BLINCK UPDATES.VI

PARAMET SORTING — SAMPLE NUMBER SORTING.VI
C:\DATA\SAMPLE NUMBER SORTING.VI

CTWMELT11.VI
LAST MODIFIED ON 6/2/97 AT 7:28 PM
PRINTED ON 6/2/97 AT 7:39 PM



CTWMELT11.VI
LAST MODIFIED ON 6/2/97 AT 7:28 PM
PRINTED ON 6/2/97 AT 7:39 PM

TIME SORT.VI
C:\DATA\TIME SORT.VI

CURSOR NAME.VI
C:\DATA\CURSOR NAME.VI

MOVING AVG.VI
C:\DATA\MOVING AVG.VI

BIT MOVING AV G.VI
C:\DATA\BIT MOVING AV G.VI

READ FROM SPREADSHEET FILE.VI
C:\LABVIEW\VI.LIB\UTILITY\FILE.LLB\READ FROM SPREADSHEET FILE.VI

REGRESSION AVG.VI
C:\DATA\REGRESSION AVG.VI

REGRESSION AVG WITH ENDS.VI
C:\DATA\REGRESSION AVG WITH ENDS.VI

REGRESSION CUTS.VI
C:\DATA\REGRESSION CUTS.VI

BACKGROUND.VI
C:\DATA\BACKGROUND.VI

DISK PRINT.VI
C:\DATA\DISK PRINT.VI

SUM OF GAUSSIANS.VI
C:\DATA\SUM OF GAUSSIANS.VI

HISTORY

"CTWMELT11.VI HISTORY"
CURRENT REVISION: 178

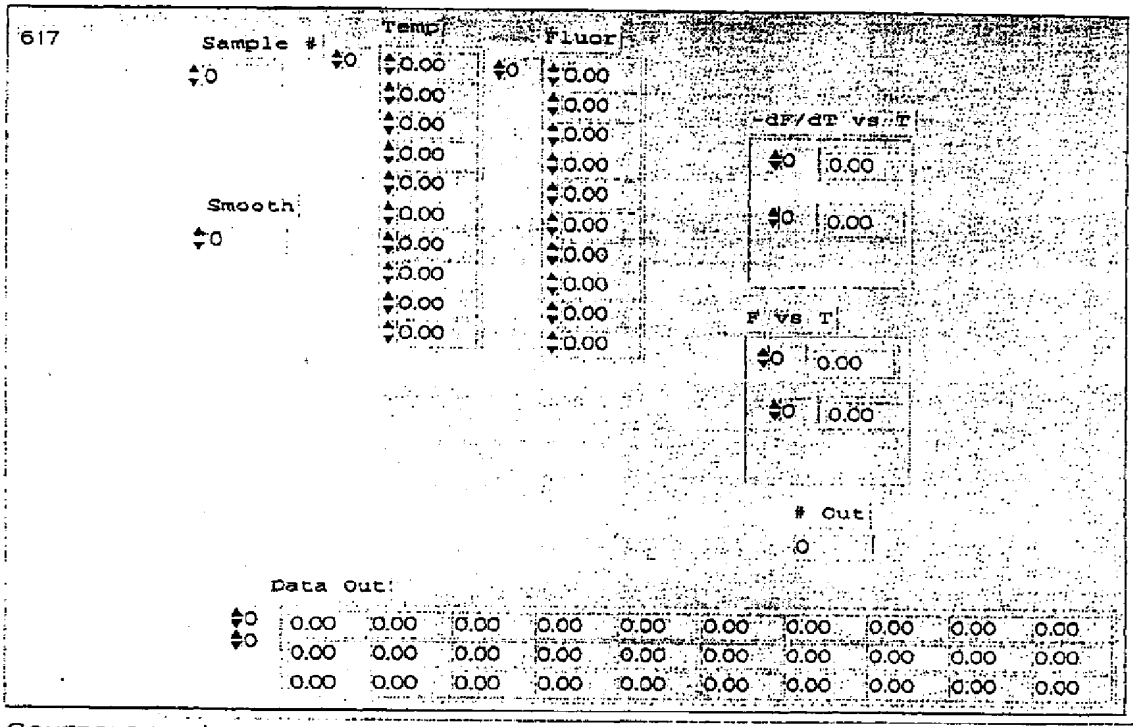
PAGE 1

REGRESSION AVG WITH ENDS.VI
LAST MODIFIED ON 3/23/97 AT 1:42 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 10:54 AM

CONNECTOR PANE



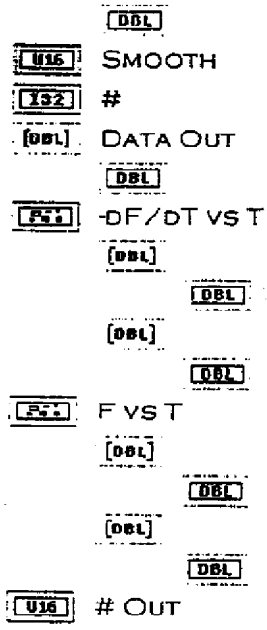
FRONT PANEL



CONTROLS AND INDICATORS

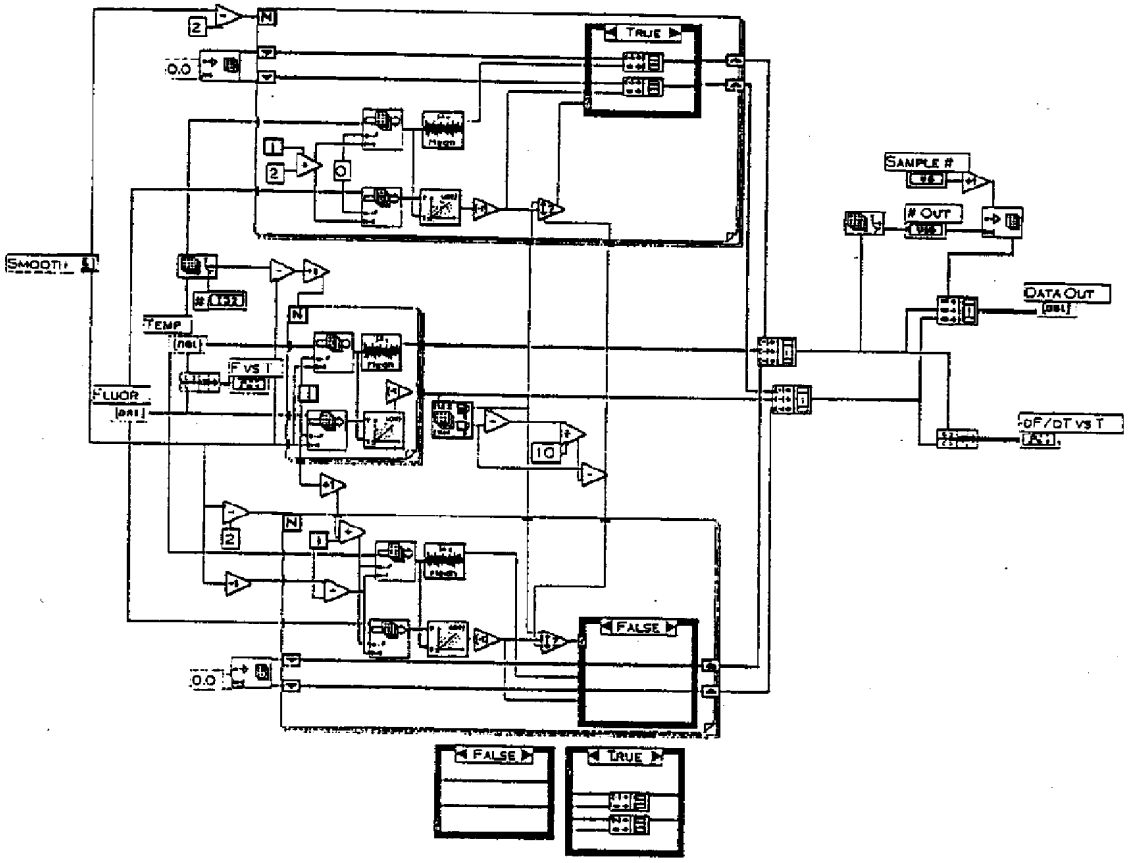
- SAMPLE #
- TEMP
- FLUOR

REGRESSION AVG WITH ENDS.VI
LAST MODIFIED ON 3/23/97 AT 1:42 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 10:54 AM



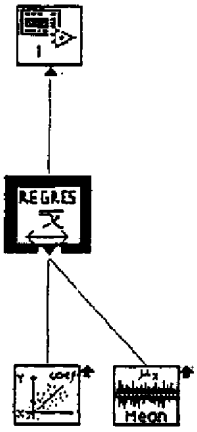
REGRESSION AVG WITH ENDS.VI
LAST MODIFIED ON 3/23/97 AT 1:42 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 10:54 AM

BLOCK DIAGRAM



POSITION IN HIERARCHY

REGRESSION AVG WITH ENDS.VI
LAST MODIFIED ON 3/23/97 AT 1:42 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 10:54 AM



LIST OF SUBVIS

MEAN.VI
C:\LABVIEW\VI.LIB\ANALYSIS\5STAT.LLB\MEAN.VI

LINEAR FIT COEFFICIENTS.VI
C:\LABVIEW\VI.LIB\ANALYSIS\6FITS.LLB\LINEAR FIT COEFFICIENTS.VI

HISTORY

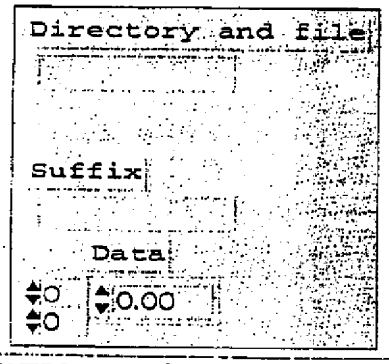
"REGRESSION AVG WITH ENDS.VI HISTORY"
CURRENT REVISION: 9

DISK PRINT.VI
LAST MODIFIED ON 5/31/97 AT 2:59 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:02 AM

CONNECTOR PANE



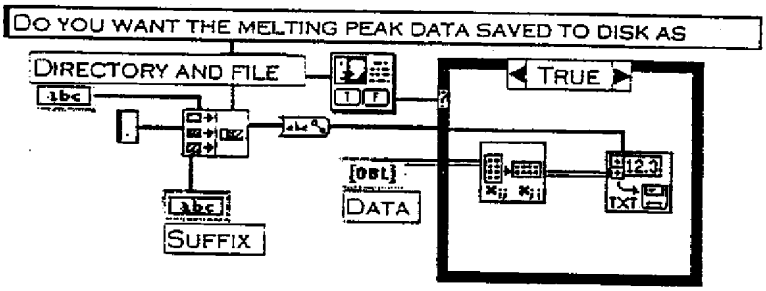
FRONT PANEL



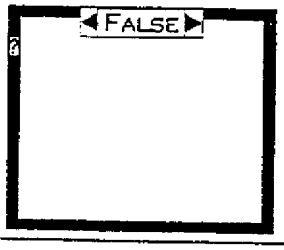
CONTROLS AND INDICATORS

DIRECTORY AND FILE
SUFFIX
DATA

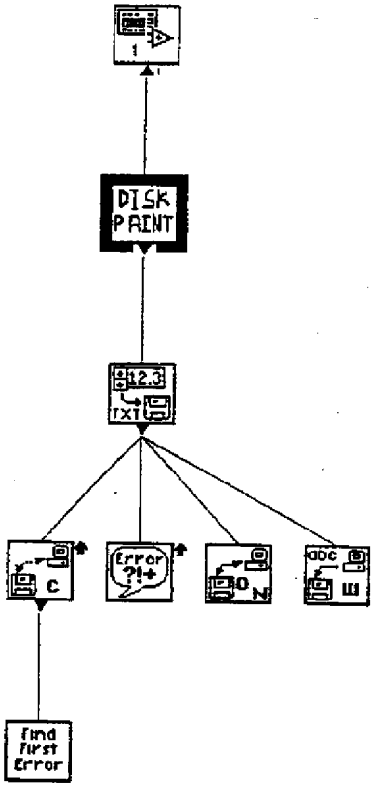
BLOCK DIAGRAM



DISK PRINT.VI
LAST MODIFIED ON 5/31/97 AT 2:59 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:02 AM



POSITION IN HIERARCHY



LIST OF SUBVIS

WRITE TO SPREADSHEET FILE.VI
C:\LABVIEW\VI.LIB\UTILITY\FILE.LLB\WRITE TO SPREADSHEET FILE.VI

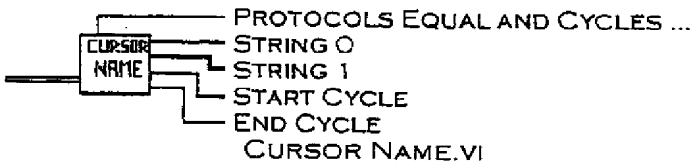
DISK PRINT.VI
LAST MODIFIED ON 5/31/97 AT 2:59 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:02 AM

HISTORY

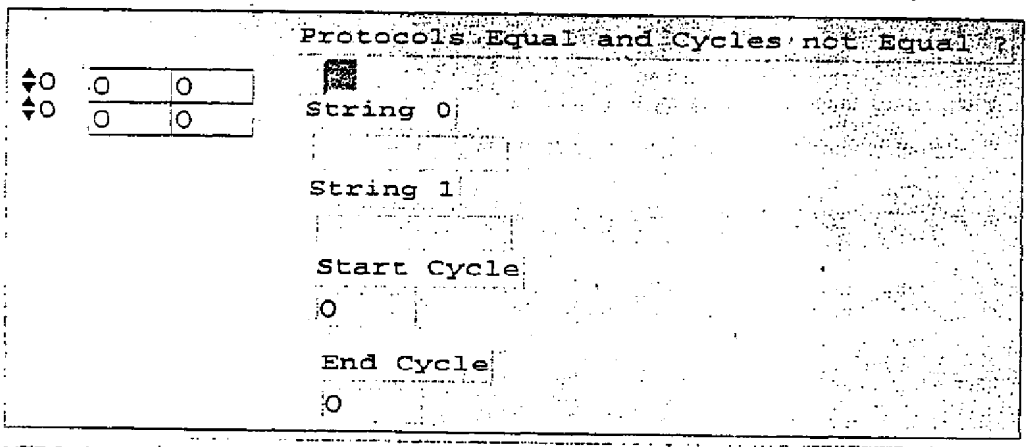
"DISK PRINT.VI HISTORY"
CURRENT REVISION: 4

CURSOR NAME.VI
LAST MODIFIED ON 5/11/97 AT 5:20 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:02 AM

CONNECTOR PANE



FRONT PANEL

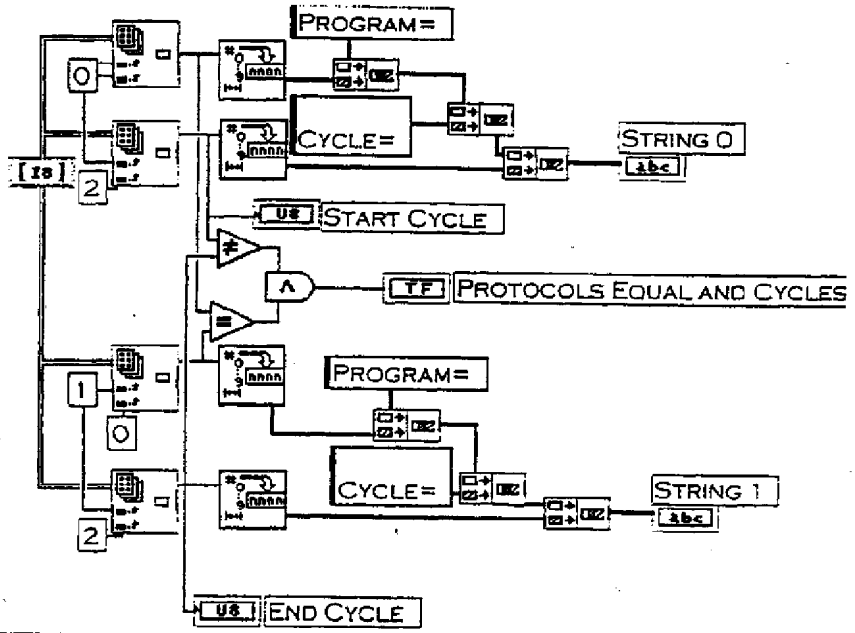


CONTROLS AND INDICATORS

- STRING 0
- STRING 1
- PROTOCOLS EQUAL AND CYCLES NOT EQUAL ?
- START CYCLE
- END CYCLE

CURSOR NAME.VI
LAST MODIFIED ON 5/11/97 AT 5:20 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:02 AM

BLOCK DIAGRAM



POSITION IN HIERARCHY



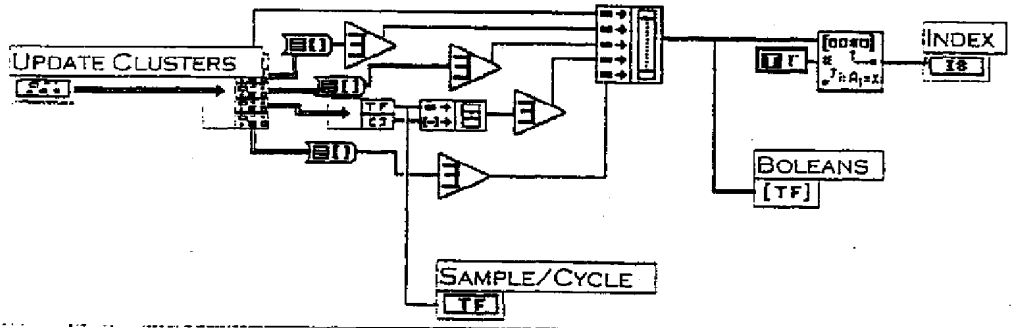
LIST OF SUBVIS

HISTORY

"CURSOR NAME.VI HISTORY"
CURRENT REVISION: 16

BLINCK UPDATES.VI
LAST MODIFIED ON 3/24/97 AT 8:59 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:01 AM

BLOCK DIAGRAM



POSITION IN HIERARCHY



LIST OF SUBVIS

HISTORY

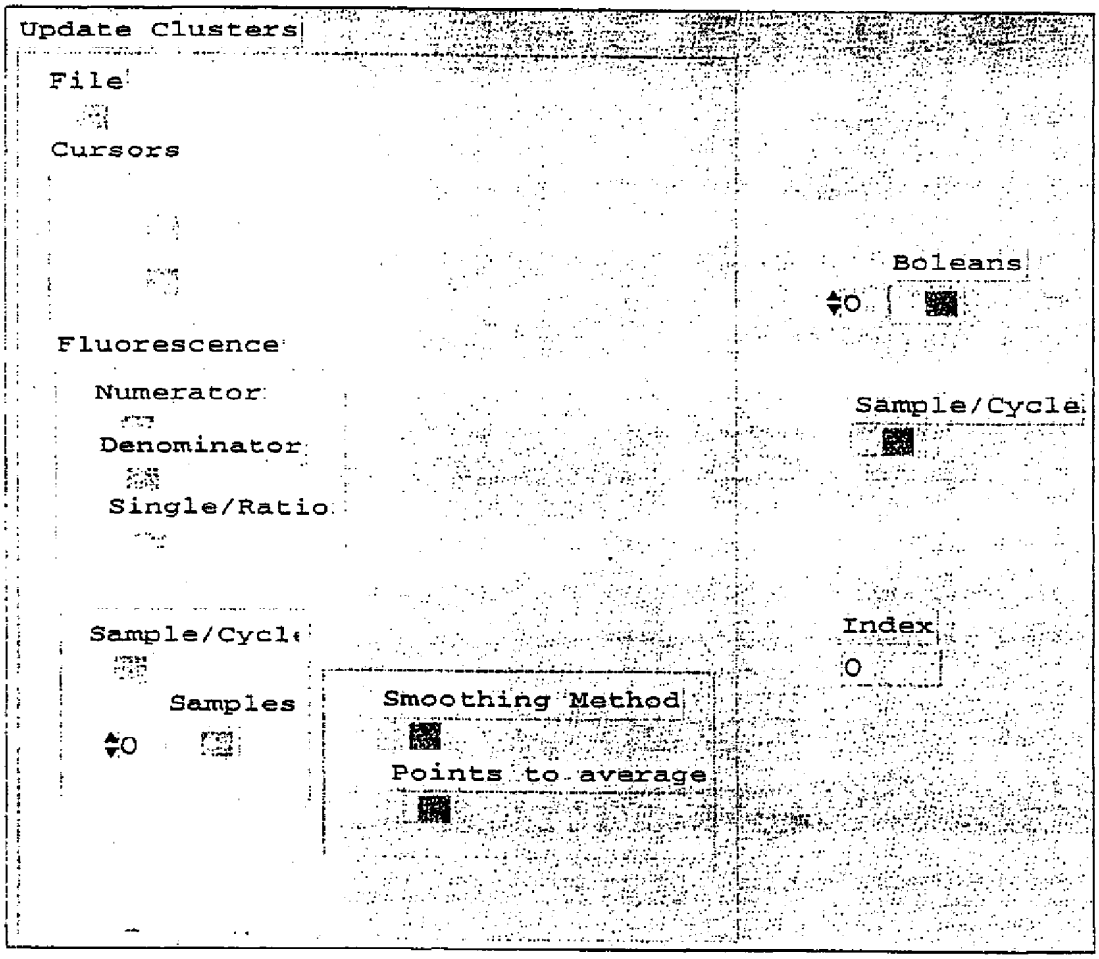
"BLINCK UPDATES.VI HISTORY"
CURRENT REVISION: 13

BLINCK UPDATES.VI
LAST MODIFIED ON 3/24/97 AT 8:59 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:01 AM

CONNECTOR PANE

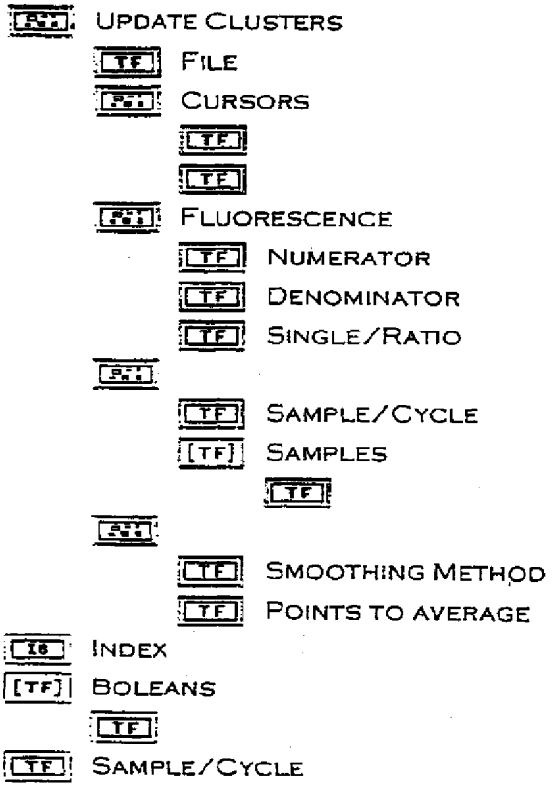


FRONT PANEL



BLINCK UPDATES.VI
LAST MODIFIED ON 3/24/97 AT 8:59 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:01 AM

CONTROLS AND INDICATORS

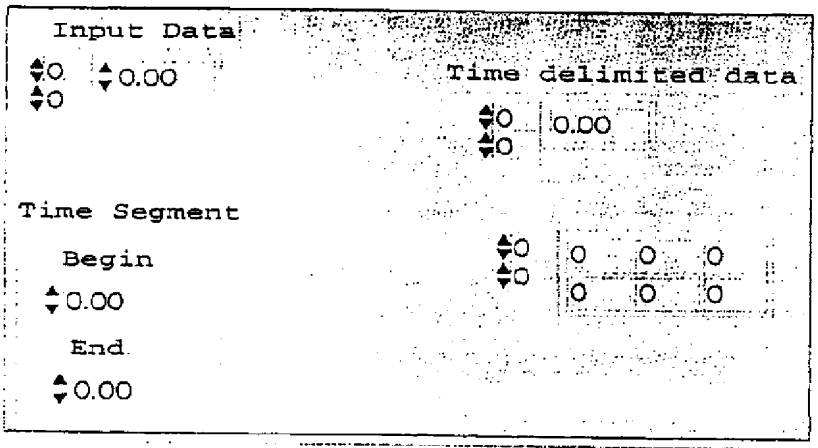


TIME SORT.VI
LAST MODIFIED ON 3/23/97 AT 10:23 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 10:55 AM

CONNECTOR PANE



FRONT PANEL

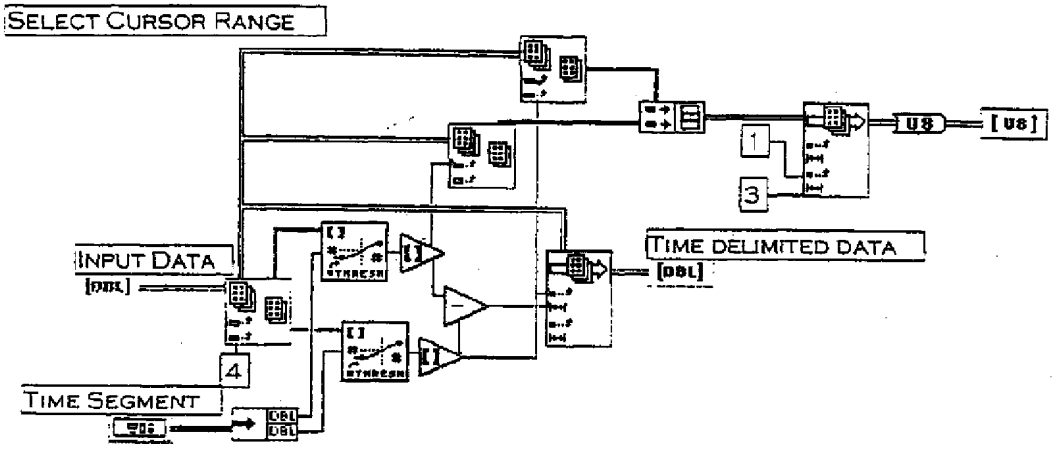


CONTROLS AND INDICATORS

- TIME SEGMENT
 - BEGIN
 - END
- INPUT DATA
 - INPUT DATA
- TIME DELIMITED DATA

TIME SORT.VI
LAST MODIFIED ON 3/23/97 AT 10:23 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 10:55 AM

BLOCK DIAGRAM



POSITION IN HIERARCHY



LIST OF SUBVIS

HISTORY

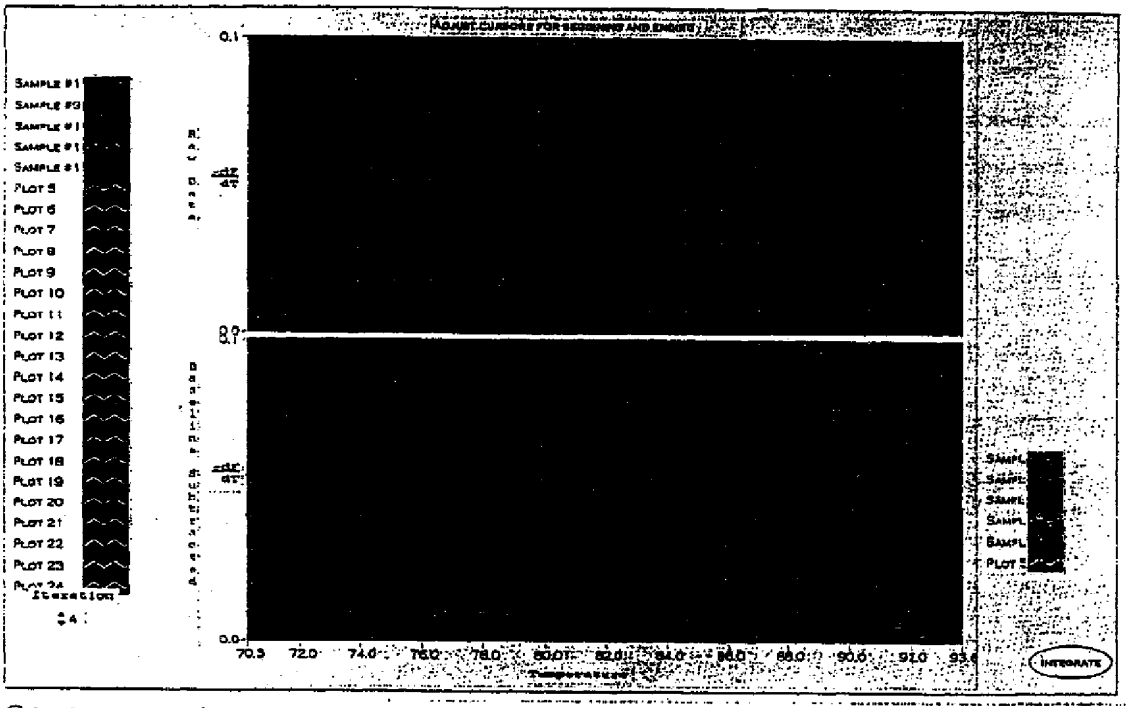
"TIME SORT.VI HISTORY"
CURRENT REVISION: 9

BACKGROUND.VI
LAST MODIFIED ON 6/3/97 AT 11:07 AM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:07 AM

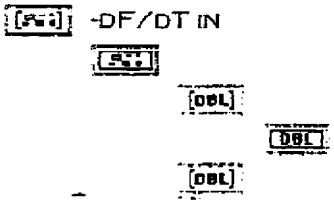
CONNECTOR PANE



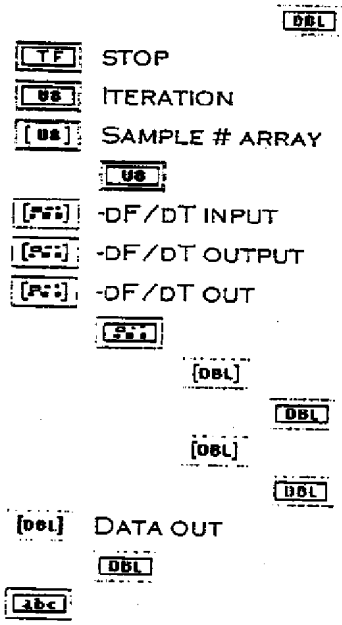
FRONT PANEL



CONTROLS AND INDICATORS

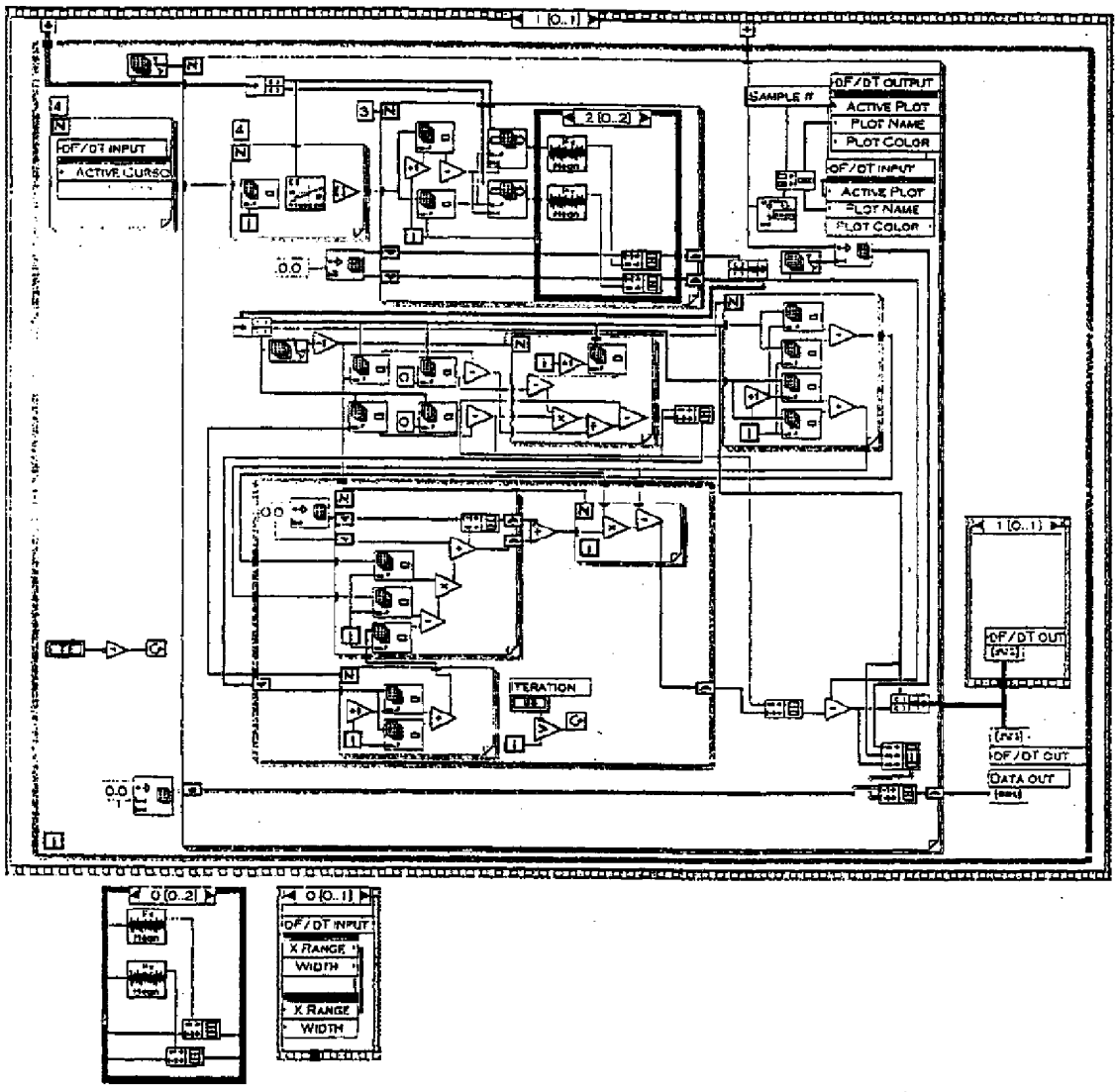


BACKGROUND.VI
LAST MODIFIED ON 6/3/97 AT 11:07 AM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:07 AM

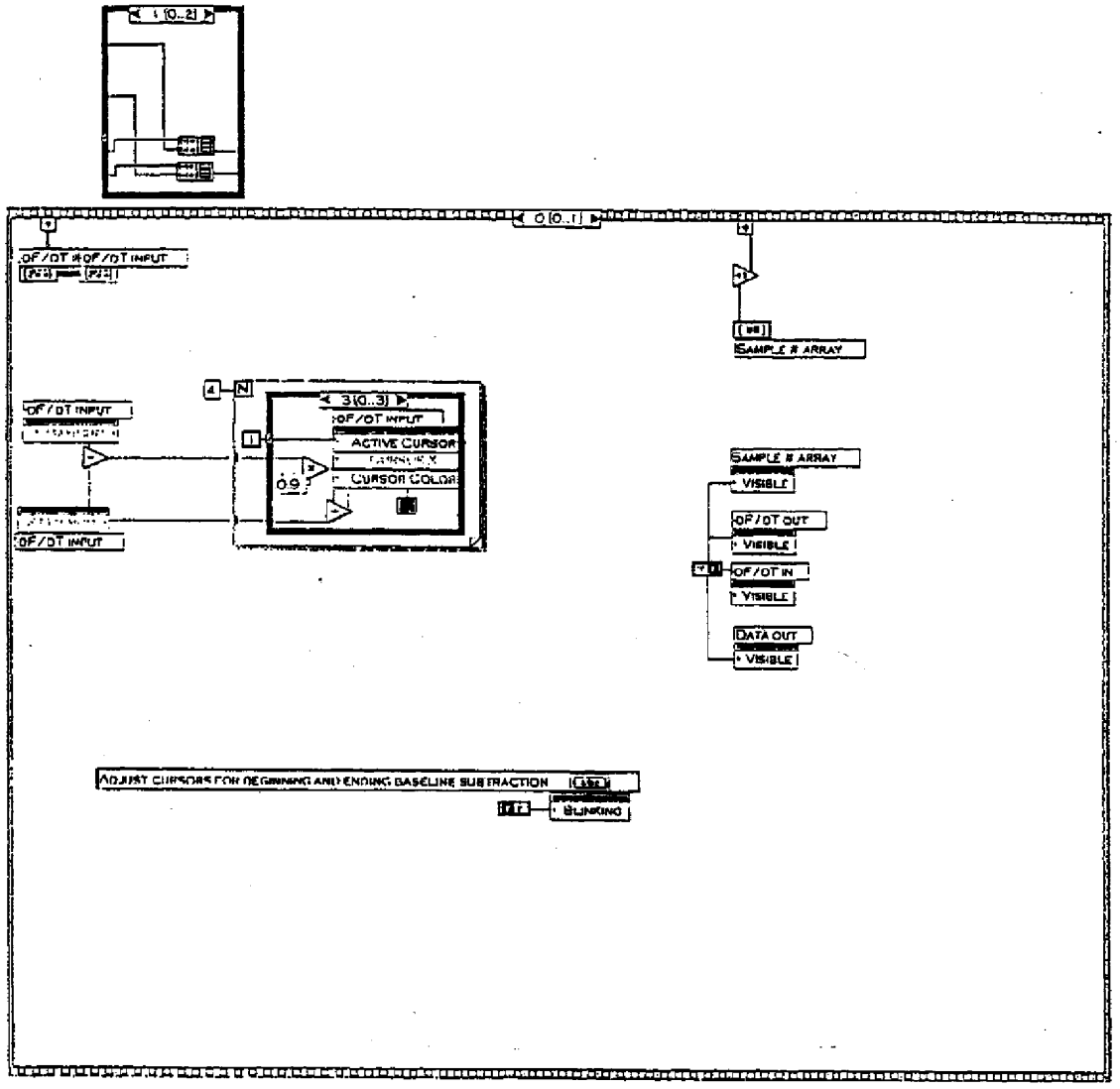


BACKGROUND.VI
LAST MODIFIED ON 6/3/97 AT 11:07 AM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:07 AM

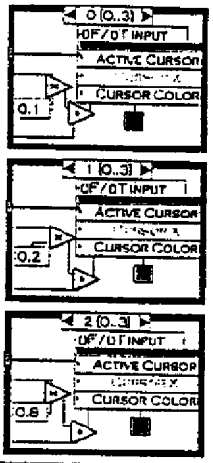
BLOCK DIAGRAM



BACKGROUND.VI
LAST MODIFIED ON 6/3/97 AT 11:07 AM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:07 AM



BACKGROUND.VI
LAST MODIFIED ON 6/3/97 AT 11:07 AM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:07 AM



POSITION IN HIERARCHY



LIST OF SUBVIS



MEAN.VI
C:\LABVIEW\VI.LIB\ANALYSIS\5STAT.LLB\MEAN.VI

HISTORY

BACKGROUND.VI
LAST MODIFIED ON 6/3/97 AT 11:07 AM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:07 AM

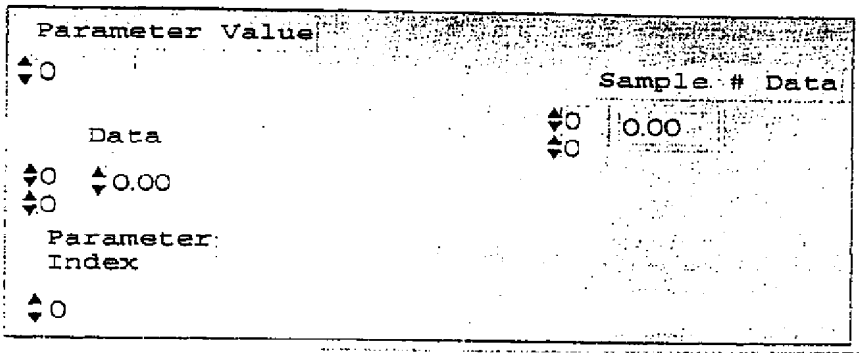
"BACKGROUND.VI HISTORY"
CURRENT REVISION: 55

SAMPLE NUMBER SORTING.VI
LAST MODIFIED ON 3/23/97 AT 10:23 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:07 AM

CONNECTOR PANE



FRONT PANEL

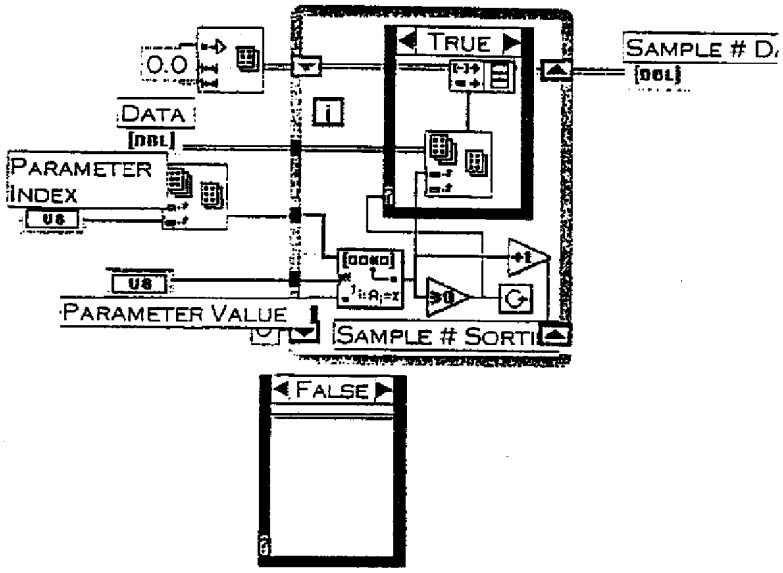


CONTROLS AND INDICATORS

- DBL DATA
- DBL
- U8 PARAMETER VALUE
- U8 PARAMETER INDEX
- DBL SAMPLE # DATA
- DBL

SAMPLE NUMBER SORTING.VI
LAST MODIFIED ON 3/23/97 AT 10:23 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:07 AM

BLOCK DIAGRAM



POSITION IN HIERARCHY



LIST OF SUBVIS

HISTORY

"SAMPLE NUMBER SORTING.VI HISTORY"
CURRENT REVISION: 9

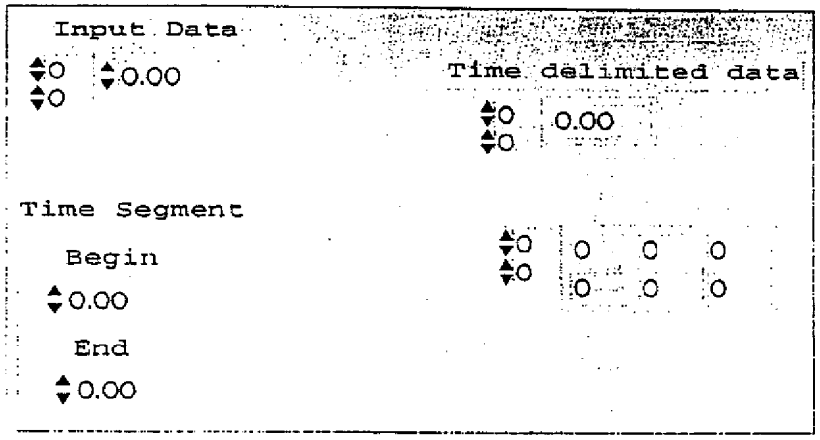
PAGE 1. TIME SORT

TIME SORT.VI
LAST MODIFIED ON 3/23/97 AT 10:23 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:08 AM

CONNECTOR PANE



FRONT PANEL

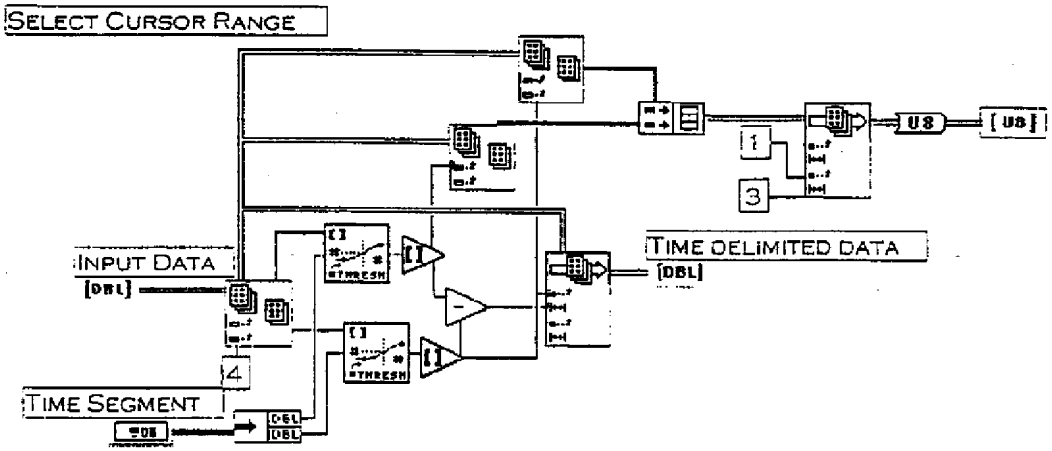


CONTROLS AND INDICATORS

- TIME SEGMENT
 - BEGIN
 - END
- INPUT DATA
 - INPUT DATA
- TIME DELIMITED DATA
 -
-
 -

TIME SORT.VI
LAST MODIFIED ON 3/23/97 AT 10:23 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:08 AM

BLOCK DIAGRAM



POSITION IN HIERARCHY



LIST OF SUBVIS

HISTORY

"TIME SORT.VI HISTORY"
CURRENT REVISION: 9

PAGE 1

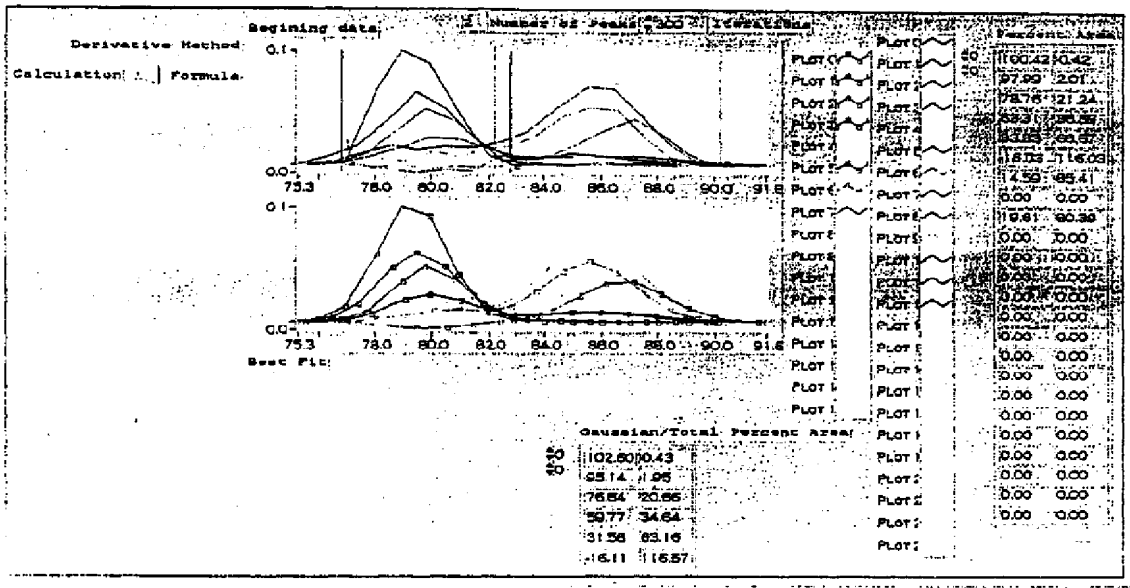
SUM OF GAUSSIANS.VI
LAST MODIFIED ON 5/19/97 AT 1:14 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:08 AM

CONNECTOR PANE

-DF/DT IN

SUM OF GAUSSIANS.VI

FRONT PANEL



CONTROLS AND INDICATORS

-DF/DT IN

ITERATIONS

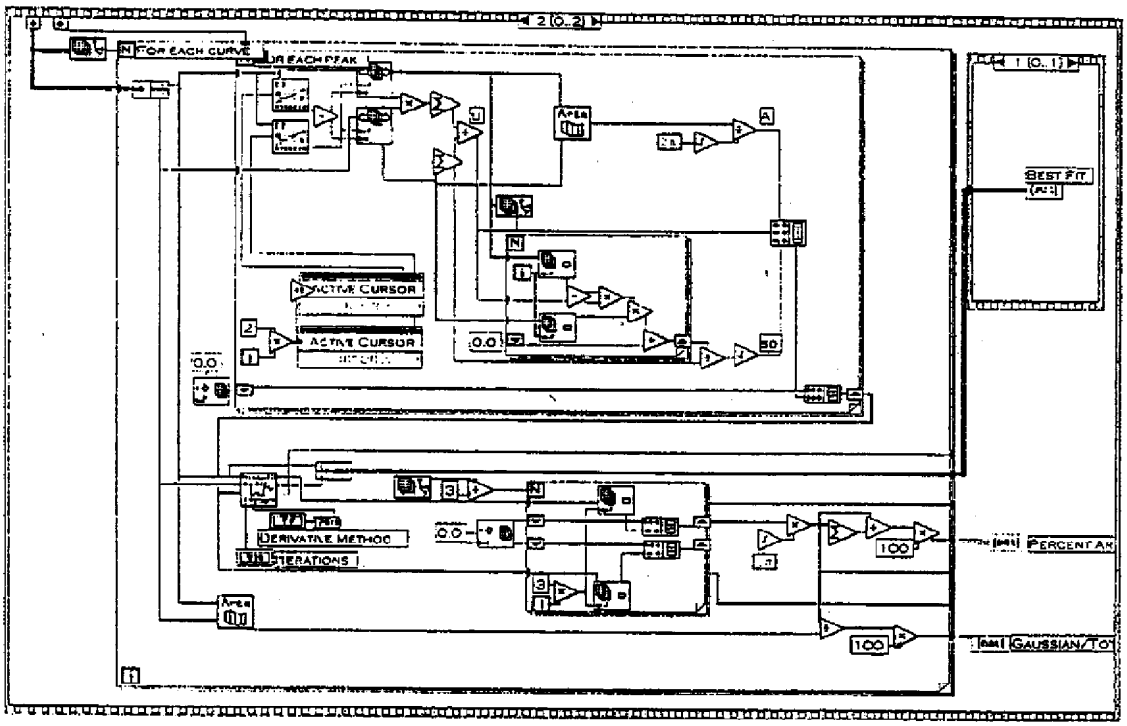
DERIVATIVE METHOD

PAGE 2

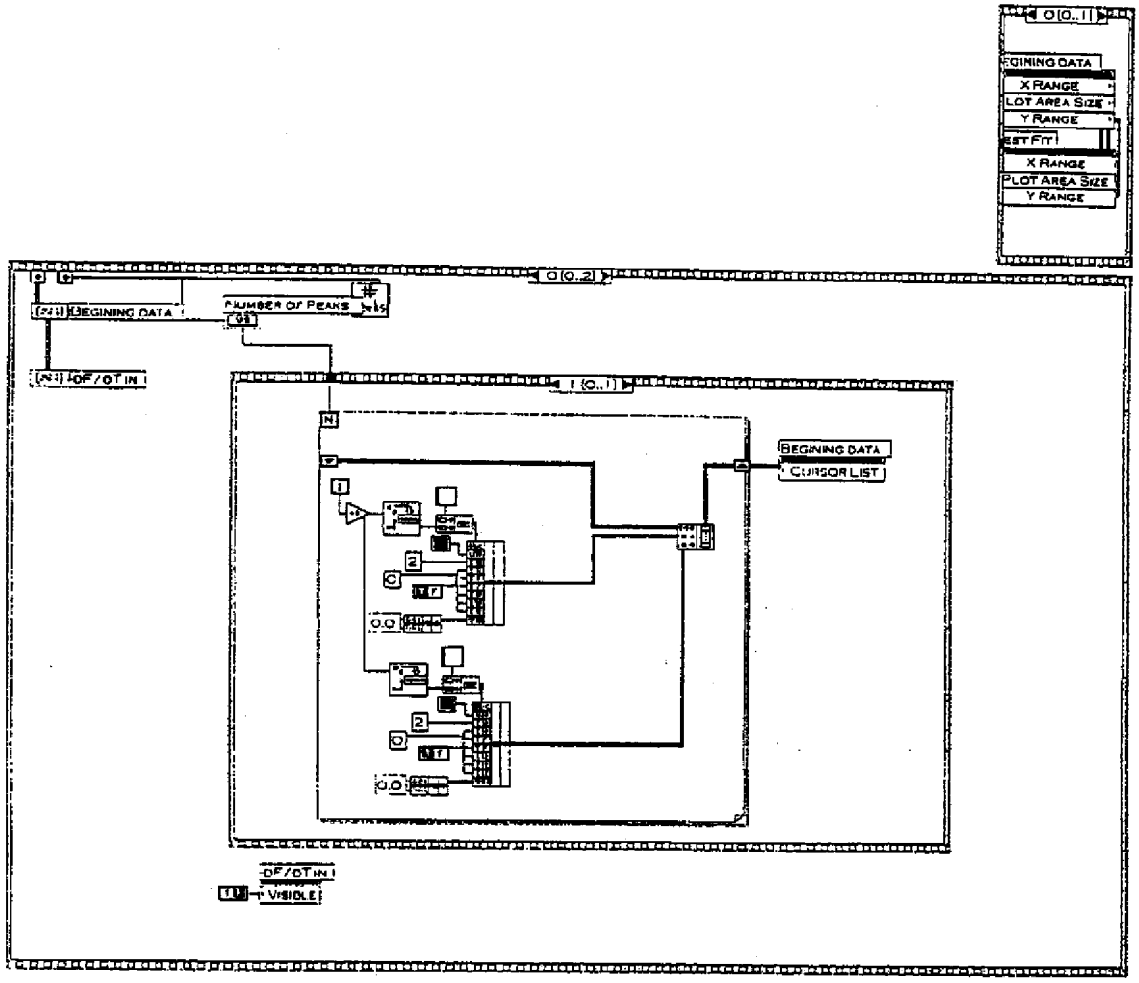
SUM OF GAUSSIANS.VI
LAST MODIFIED ON 5/19/97 AT 1:14 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:08 AM

- BEGINING DATA
- BEST FIT
- NUMBER OF PEAKS
- PERCENT AREA
- GAUSSIAN/TOTAL PERCENT AREA

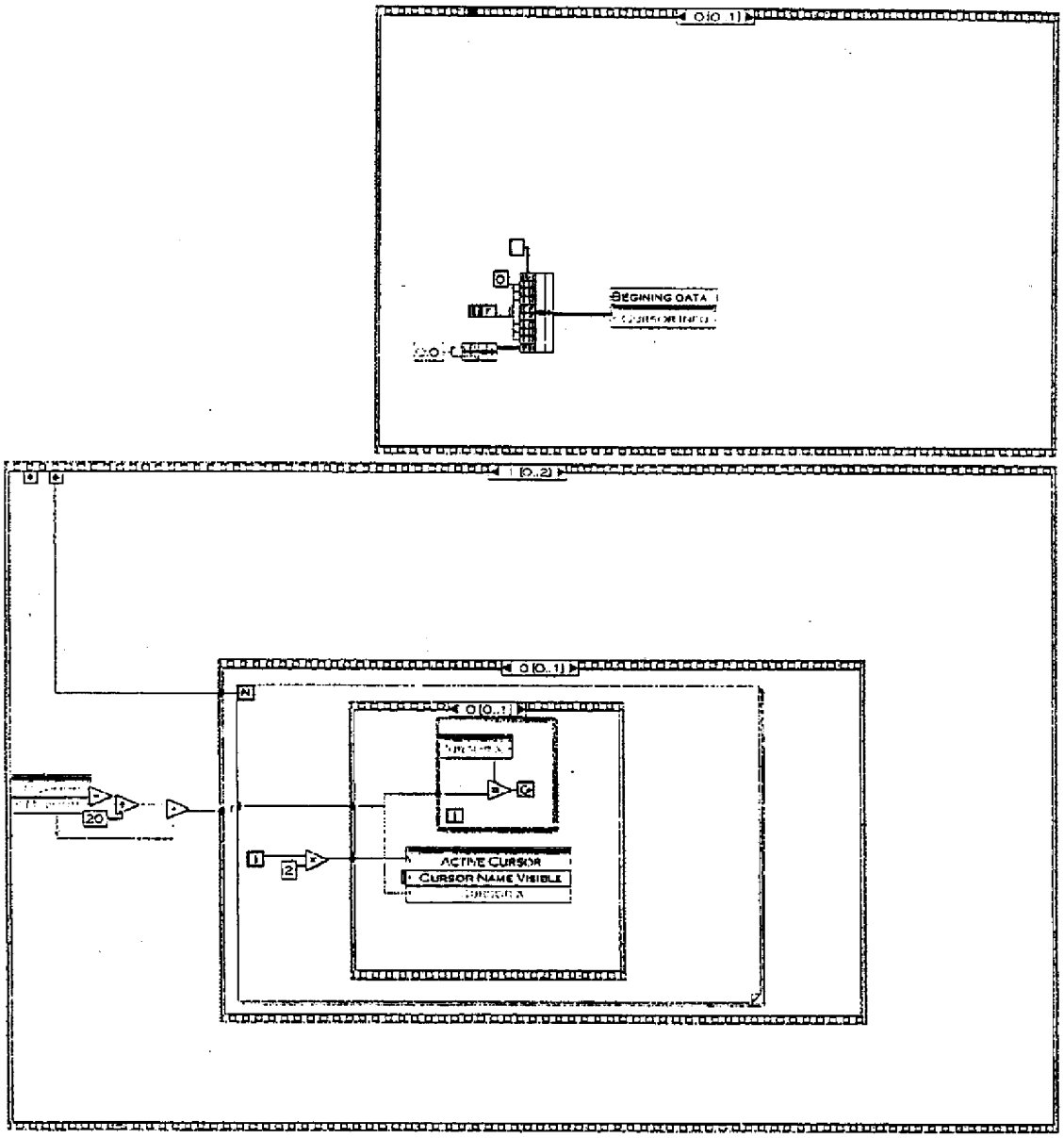
BLOCK DIAGRAM



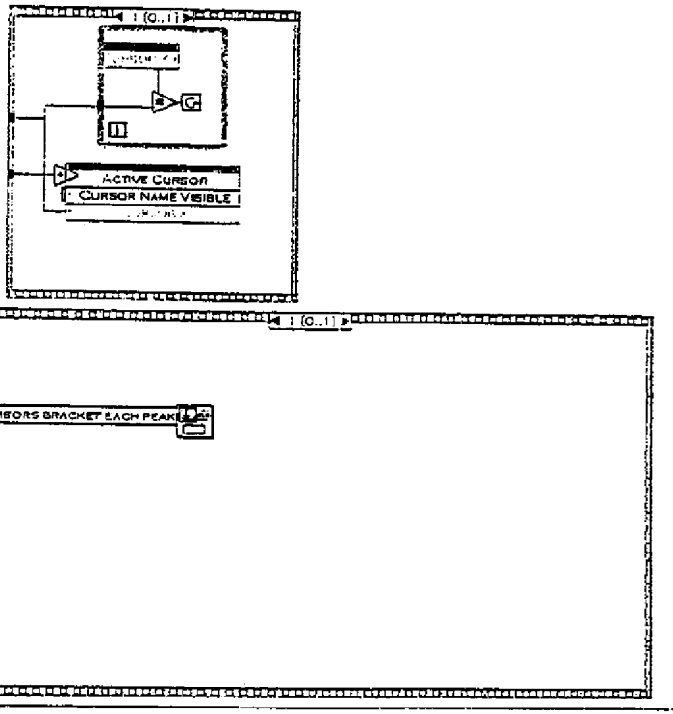
SUM OF GAUSSIANS.VI
LAST MODIFIED ON 5/19/97 AT 1:14 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:08 AM



SUM OF GAUSSIANS.VI
LAST MODIFIED ON 5/19/97 AT 1:14 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:08 AM

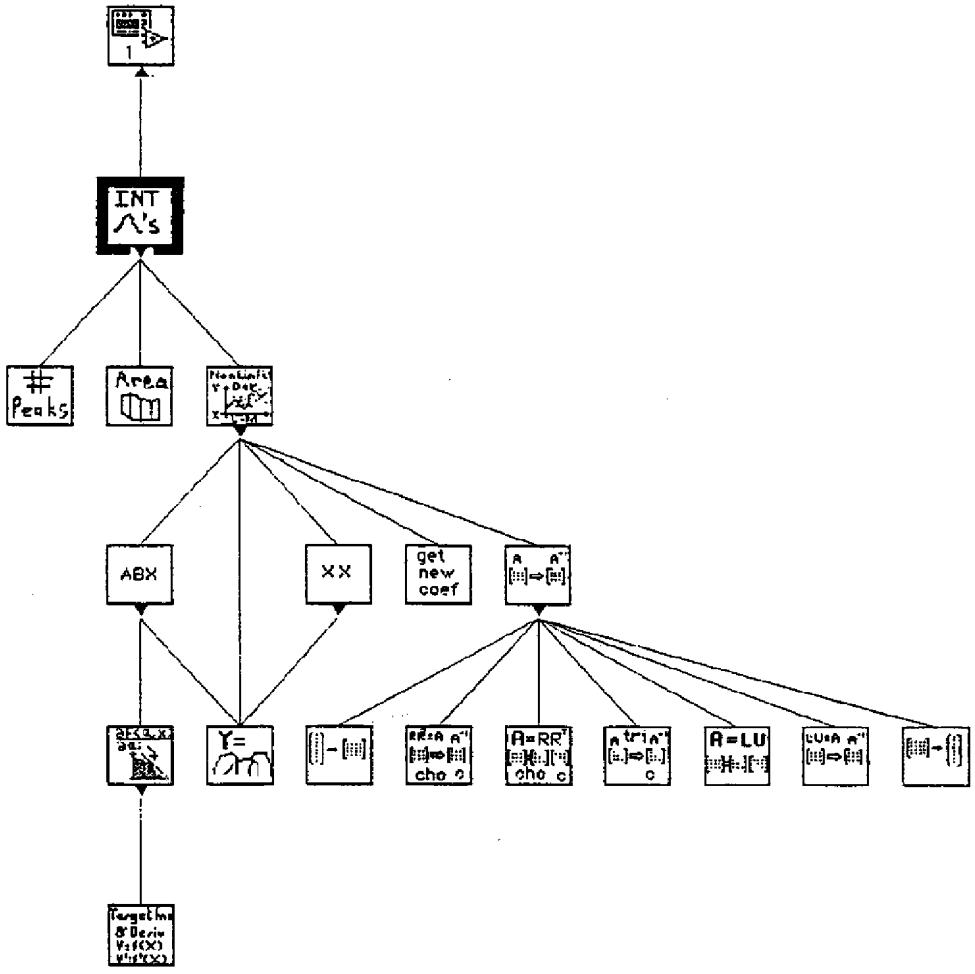


SUM OF GAUSSIANS.VI
LAST MODIFIED ON 5/19/97 AT 1:14 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:08 AM



POSITION IN HIERARCHY

SUM OF GAUSSIANS.VI
LAST MODIFIED ON 5/19/97 AT 1:14 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:08 AM



LIST OF SUBVIS

FIT SUM OF GAUSSIANS.VI
C:\DATA\FIT SUM OF GAUSSIANS.VI

PEAK#.VI
C:\DATA\PEAK#.VI

SUM OF GAUSSIANS.VI
LAST MODIFIED ON 5/19/97 AT 1:14 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:09 AM

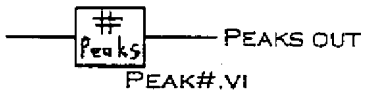
TRAPEZOID AREA.VI
C:\DATA\TRAPEZOID AREA.VI

HISTORY

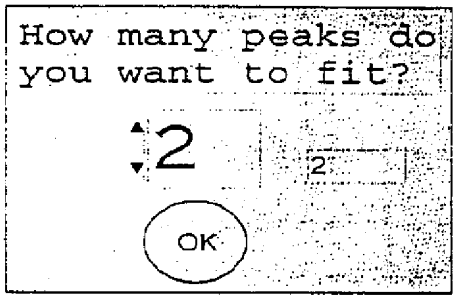
"SUM OF GAUSSIANS.VI HISTORY"
CURRENT REVISION: 28

PEAK#.VI
LAST MODIFIED ON 4/16/97 AT 7:31 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:09 AM

CONNECTOR PANE



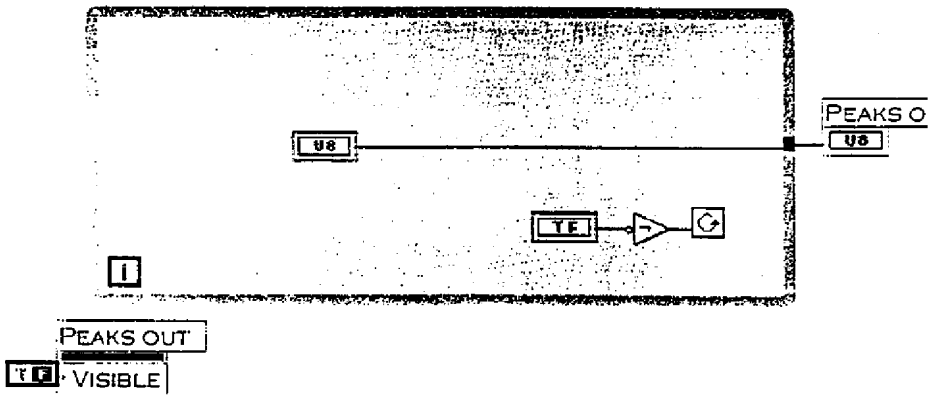
FRONT PANEL



CONTROLS AND INDICATORS

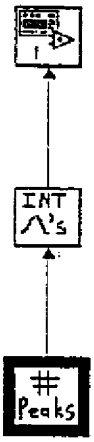
U8
TF STOP
U8 PEAKS OUT

BLOCK DIAGRAM



PEAK#.VI
LAST MODIFIED ON 4/16/97 AT 7:31 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:09 AM

POSITION IN HIERARCHY



LIST OF SUBVIS

HISTORY

"PEAK#.VI HISTORY"
CURRENT REVISION: 6

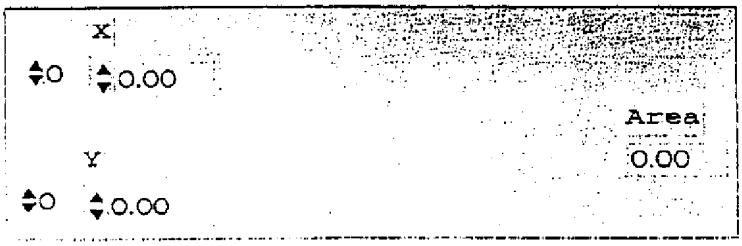
TRAPEZOID AREA.VI
LAST MODIFIED ON 4/24/97 AT 9:26 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:09 AM

CONNECTOR PANE



TRAPEZOID AREA.VI

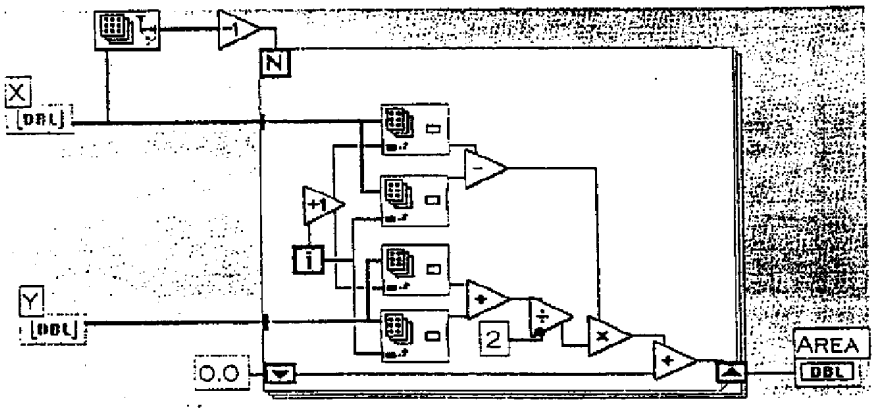
FRONT PANEL



CONTROLS AND INDICATORS

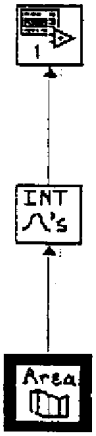
[DBL] Y
[DBL] X
[DBL] AREA

BLOCK DIAGRAM



TRAPEZOID AREA.VI
LAST MODIFIED ON 4/24/97 AT 9:26 PM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:09 AM

POSITION IN HIERARCHY



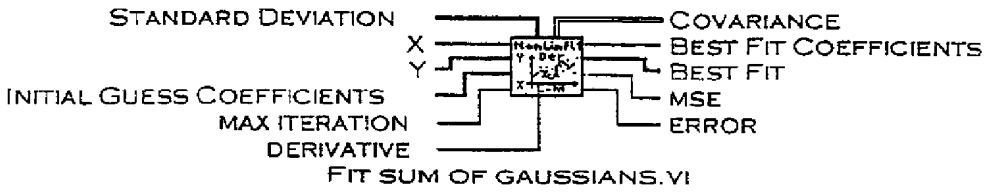
LIST OF SUBVIS

HISTORY

"TRAPEZOID AREA.VI HISTORY"
CURRENT REVISION: 1

FIT SUM OF GAUSSIANS.VI
LAST MODIFIED ON 5/16/97 AT 12:24 AM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:11 AM

CONNECTOR PANE



FIT SUM OF GAUSSIANS.VI
LAST MODIFIED ON 5/16/97 AT 12:24 AM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:11 AM

NONLINEAR LEV-MAR FIT:
==========

THIS VI USES THE LEVENBERG-MARQUARDT ALGORITHM TO DETERMINE THE LEAST SQUARES SET OF COEFFICIENTS THAT BEST FIT THE SET OF INPUT DATA POINTS(X,Y) AS EXPRESSED BY A NONLINEAR FUNCTION Y=F(X,A) WHERE A IS THE SET OF COEFFICIENTS. THIS VI ALSO GIVES THE BEST FIT CURVE Y=F(X,A).

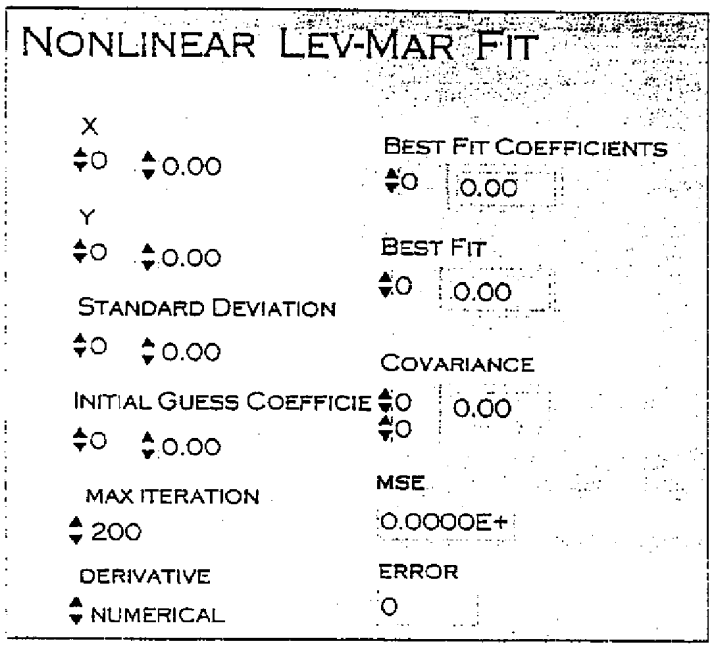
THE USER NEEDS TO OPEN A SUB-VI "TARGET FNC & DERIV NONLIN" AND INPUTS HIS/HER NONLINEAR FUNCTION F(X,A) IN THE FORMULA NODE. IF THE USER CHOOSE FORMULA CACULATION FOR DERIVATIVE METHOD, HE/SHE NEEDS TO INPUT THE PARTIAL DERIATIVE OF F(X,A) WITH RESPECT TO A AS WELL.

INPUTS:
X: EXPERIMENT DATA POINTS.
Y: EXPERIMENT DATA POINTS.
STANDARD DEVIATION: STANDARD DEVIATION OF EACH EXPERIMENT DATA.IF YOU DON'T HAVE KNOWLEDGE ABOUT THIS PARAMETER, JUST LEAVE IT EMPTY.
INITIAL GUESS COEFFICIENTS: YOUR GUESSED COEFFICIENTS. IF THIS IS TOO FAR FROM THE APPROPRIATE COEFFICIENTS, THE VI MAYBE WILL FAIL TO RETURN THE APPROPRIATE COEFICIENTS AND BEST FIT CURVE.
MAX ITERATION: MAX ITERATION THE ALGROTHIM WILL TRY. IF IT CAN NOT CONVERGE WHEN IT REACHES THE MAX ITERATION. THE VI WILL RETURN AN ERROR.
DERIVATIVE: THERE ARE TWO WAYS TO CACULATE THE PARTIAL DERIVATIVE OF F(X,A) WITH RESPECT TO COEFFICIENTS A. IF YOU CHOOSE NEMERICAL CACULATION, THE VI WILL USE NUMERICAL METHOD TO CACULATE THEM INTERNALLY. IF YOU CHOOSE FORMULA CACULATION, YOU NEED TO INPUT THE DERIVATIVE FORMULA IN THE SUBVI TARGET FNC & DERIV NONLIN. FORMULA CACULATION IS MORE PRECISE THAN NUMERICAL CACULATION.

OUTPUTS:
BEST GUESS COEFFICIENTS: THE LEAST SQUARES COEFFICIENTS.
BEST FIT: THE BEST FIT CURVE F(X,A).
COVARIANCE: COVARIANCE MATRIX OF BEST GUESS COEFFICIENTS.
MSE: MSE=1/N*SUM[(Y(I)-F(X(I),A))/STD(I)]^2)
(STD: STANDARD DEVIATION)

FIT SUM OF GAUSSIANS.VI
LAST MODIFIED ON 5/16/97 AT 12:24 AM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:11 AM

FRONT PANEL



CONTROLS AND INDICATORS

[DBL] X
X IS THE ARRAY OF DATA POINTS REPRESENTING THE INDEPENDENT VARIABLE X.

[DBL] X IS THE INPUT ARRAY OF DATA POINTS REPRESENTING THE DEPENDENT VARIABLE X.

[DBL] Y
Y IS THE ARRAY OF DATA POINTS REPRESENTING THE OBSERVED VALUES OF THE DEPENDENT VARIABLE Y.

[DBL]

[DBL] INITIAL GUESS COEFFICIENTS
INITIAL GUESS COEFFICIENTS IS YOUR INITIAL GUESS OF THE SOLUTION COEFFICIENTS.

[DBL]

FIT SUM OF GAUSSIANS.VI
LAST MODIFIED ON 5/16/97 AT 12:24 AM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:11 AM

I32 MAX ITERATION
MAX ITERATION IS THE MAXIMUM EXECUTING ITERATIONS USED IN THE NONLINEAR FIT ALGORITHM.

IF MAX ITERATIONS IS EXCEEDED AND A SOLUTION IS NOT FOUND, THIS VI WILL RETURN AN ERROR. AT THAT POINT, YOU MUST INCREASE MAX ITERATIONS, ADJUST THE INITIAL GUESS COEFFICIENTS, OR CHANGE THE TARGET FUNCTION.

DERIVATIVE
DERIVATIVE IS USED TO SPECIFY THE METHOD USED TO CALCULATE THE JACOBIAN.

0: NUMERICAL APPROXIMATION
1: FORMULA EVALUATION - YOU MUST SPECIFY THE FORMULA FOR THE JACOBIAN IN THE TARGET FNC & DERIV NONLIN VI DIAGRAM.

[DBL] STANDARD DEVIATION
STANDARD DEVIATION IS THE ARRAY OF STANDARD DEVIATIONS, SIGMA[i], FOR DATA POINT (X[i],Y[i]).

IF THE STANDARD DEVIATIONS ARE ALL EQUAL OR IF THEY ARE UNKNOWN, LEAVE THIS CONTROL UNWIRED AND THE STANDARD DEVIATIONS WILL BE SET TO 1.0.

DBL

[DBL] BEST FIT COEFFICIENTS
BEST FIT COEFFICIENTS IS THE ARRAY OF COEFFICIENTS THAT MINIMIZE THE CHI-SQUARE ERROR BETWEEN THE SOLUTION VECTOR AND THE OBSERVED Y VALUES.

DBL

[DBL] BEST FIT
BEST FIT IS THE FITTED DATA Z[i] = F(X[i],A), WHERE A IS THE SET OF BEST FIT COEFFICIENTS.

DBL

DBL MSE
MSE IS THE CHI-SQUARED ERROR BETWEEN THE BEST FIT AND THE OBSERVED Y VALUES.

I32 ERROR
YOU CAN WIRE THIS OUTPUT TO THE FIND FIRST ERROR VI TO PRODUCE AN ERROR CLUSTER. THIS CLUSTER CAN THEN BE WIRED TO THE SIMPLE ERROR HANDLER VI OR THE GENERAL ERROR HANDLER VI FOR AN IMMEDIATE REPORT ON ANY ERRORS. YOU CAN ALSO LOOK UP ERROR CODES IN THE ERROR CODES APPENDIX IN THE LABVIEW CROSS REFERENCE MANUAL.

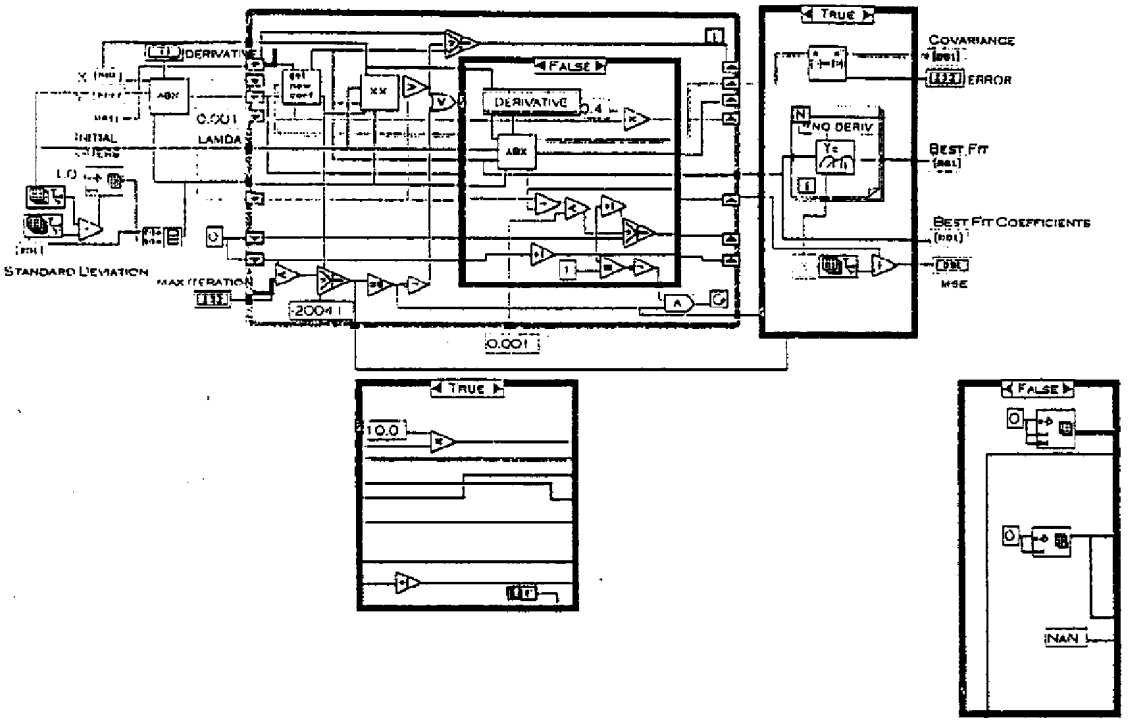
FIT SUM OF GAUSSIANS.VI
LAST MODIFIED ON 5/16/97 AT 12:24 AM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:11 AM

[DBL] COVARIANCE
COVARIANCE IS THE MATRIX OF COVARIANCES C.

C[J,K] IS THE COVARIANCE BETWEEN A[J] AND A[K], AND C[]J,J] IS THE VARIANCE OF A[J].

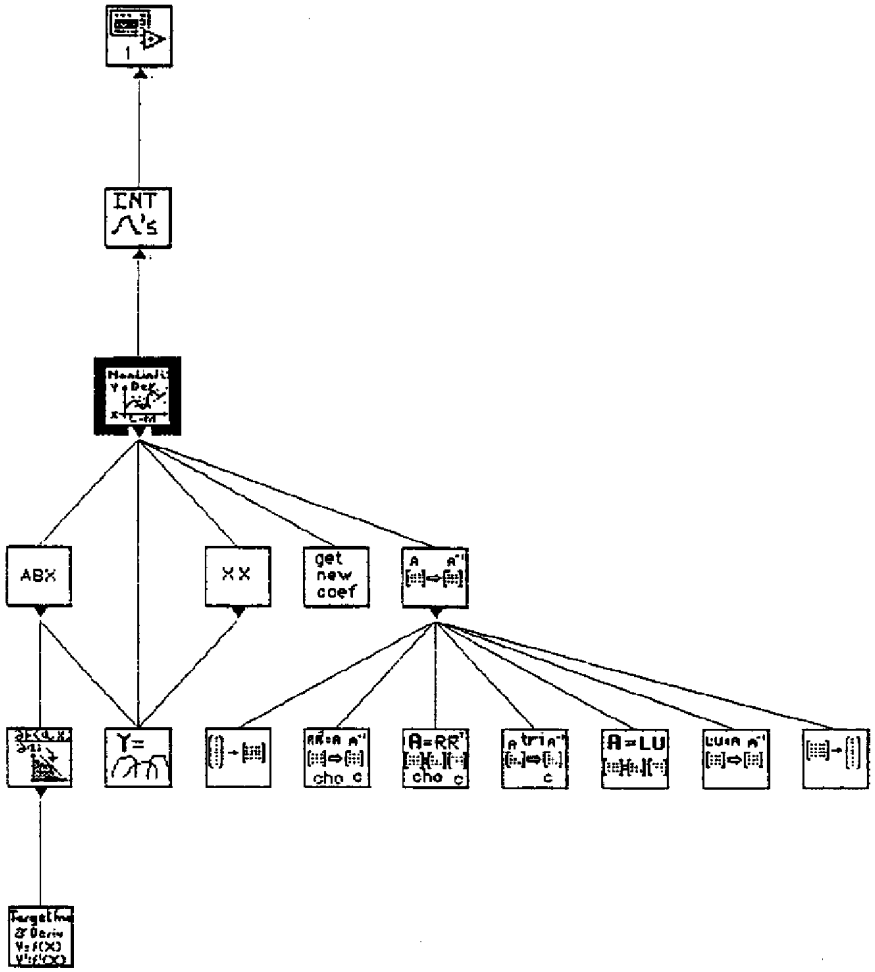
DBL

BLOCK DIAGRAM



POSITION IN HIERARCHY

FIT SUM OF GAUSSIANS.VI
LAST MODIFIED ON 5/16/97 AT 12:24 AM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:11 AM



LIST OF SUBVIS

INVERSE MATRIX.VI
C:\LABVIEW\VI.LIB\ANALYSIS\7LINALG.LLB\INVERSE MATRIX.VI

GET NEW COEFFICIENTS.VI
C:\LABVIEW\VI.LIB\ANALYSIS\6FITS.LLB\GET NEW COEFFICIENTS.VI

FIT SUM OF GAUSSIANS.VI
LAST MODIFIED ON 5/16/97 AT 12:24 AM
PRINTED ON 6/3/97 AT 11:11 AM



GAUSS LEV-MAR ABX.VI
C:\DATA\GAUSS LEV-MAR ABX.VI



GAUSS LEV-MAR XX.VI
C:\DATA\GAUSS LEV-MAR XX.VI



SUM OF GAUSIANS.VI
C:\DATA\SUM OF GAUSIANS.VI

HISTORY

"FIT SUM OF GAUSSIANS.VI HISTORY"
CURRENT REVISION: 24
REV. 8 SUN, SEP 25, 1994 1:48:18 PM GREGGF
VI WAS CONVERTED FROM LABVIEW VERSION 3.1B1 TO LABVIEW VERSION 3.1.

【配列表】

(1) 全般情報

（ｉ）出願人：ウィットワー，カール，ティー．；リリー，カーク，エム．；ラスマッセン，ランディ，ピー．

（ｉｉ）発明の名称　ＰＣＲ中のハイブリダイゼーションのモニタリング

（ｉｉｉ）配列数　２７

（ｉｖ）住所または居所

（Ａ）住所　Thorpe, North & Western, L.L.P

（Ｂ）番地　9035 South 700 East, Suite 200

（Ｃ）市　Sandy

（Ｄ）州　Utah

（Ｅ）国名　USA　（Ｆ）郵便番号　84070

（ｖ）コンピュータ読み取り可能な形態

（Ａ）媒体形式　３．５インチ１．４４ＭＢディスケット

（Ｂ）コンピュータ　東芝Ｔ２１５０ＣＤＳ

（Ｃ）オペレーティング・システム　Ｗｉｎｄｏｗｓ９５

（Ｄ）ソフトウェア　ワードパーフェクト７．０

（ｖｉ）現出願データ

（Ａ）出願番号

（Ｂ）出願日

（Ｃ）分類

（ｖｉｉ）優先権データ

（Ａ）出願番号：　US 08/658,993

（Ｂ）出願日：　1996年6月4日

（ｖｉｉ）優先権データ

（Ａ）出願番号：　US 08/818,267

（Ｂ）出願日：　1997年3月17日

（ｖｉｉｉ）代理人情報

（Ａ）氏名：Alan J. Howarth

（Ｂ）識別番号： 36,553

（Ｄ）事件整理番号： 8616.CIP7

（ｉｘ）連絡先

（Ａ）電話番号： (801)566-6633

（Ｂ）ファックス番号： (801)566-0750

（２）配列番号１の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：２０塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号１

CGTGGTGGAC TTCTCTCAAT 20

（２）配列番号２の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：２０塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号２

AGAAGATGAG GCATAGCAGC 20

（２）配列番号３の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：３５塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号３

CAAACAGACA CCATGGTGCA CCTGACTCCT GAGGA 35

（２）配列番号４の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：３０塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号４

AAGTCTGCCG TTACTGCCCT GTGGGGCAAG 30

（２）配列番号５の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：２７塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号５

TCTGCCGTTA CTGCCCTGTG GGGCAAG 27

（２）配列番号６の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：２０塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号６

CAACTTCATC CACGTNCACC 20

（２）配列番号７の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：１８塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号７

CTGTCCGTGA CGTGGATT 18

（２）配列番号８の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：１８塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号８

AAGTCCTCCG AGTATAGC 18

（２）配列番号９の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：４６塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号９

TAATCTGTAA GAGCAGATCC CTGGACAGGC GAGGAATACA GGTATT 46

（２）配列番号１０の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：４６塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号１０

TAATCTGTAA GAGCAGATCC CTGGACAGGC AAGGAATACA GGTATT 46

（２）配列番号１１の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：２０塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号１１

TAATCTGTAA GAGCAGATCC 20

（２）配列番号１２の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：２０塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号１２

TGTTATCACA CTGGTGCTAA 20

（２）配列番号１３の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：２３塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号１３

AATACCTGTA TTCCTCGCCT GTC 23

（２）配列番号１４の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：２０塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号１４

ATGCCTGGCA CCATTAAAGA 20

（２）配列番号１５の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：２０塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号１５

GCATGCTTTG ATGACGCTTC 20

（２）配列番号１６の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：２０塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号１６

CGGATCTTCT GCTGCCGTCG 20

（２）配列番号１７の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：２０塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号１７

CCTCTGACGT CCATCATCTC 20

（２）配列番号１８の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：３１塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号１８

GAAGTCTGCC GTTACTGCCC TGTGGGGCAA G 31

（２）配列番号１９の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：２６塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号１９

CTGCCGTACT GCCCTGTGGG GCAAGG 26

（２）配列番号２０の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：２６塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号２０

ATGCCCTCCC CCATGCCATC CTGCGT 26

（２）配列番号２１の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：２０塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号２１

CAACTTCATC CACGTTCACC 20

（２）配列番号２２の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：２７塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号２２

GTCTGCCGTT ACTGCCCTGT GGGGCAA 27

（２）配列番号２３の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：３２塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号２３

CCTCAAACAG ACACCATGGT GCACCTGACT CC 32

（２）配列番号２４の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：３０塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号２４

GAAGTCTGCC GTTACTGCCC TGTGGGGCAA 30

（２）配列番号２５の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：２３塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号２５

TGAAGGAGAA GGTGTCTGCG GGA 23

（２）配列番号２６の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：２５塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号２６

CCTCGGCTAA ATAGTAGTGC GTCGA 25

（２）配列番号２７の情報

（ｉ）配列の特性

（Ａ）配列の長さ：２０塩基対

（Ｂ）配列型：核酸

（Ｃ）鎖の数：一本鎖

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ｘｉ）配列の説明：配列番号２７

AGGACGGTGC GGTGAGAGTG 20

【図１】

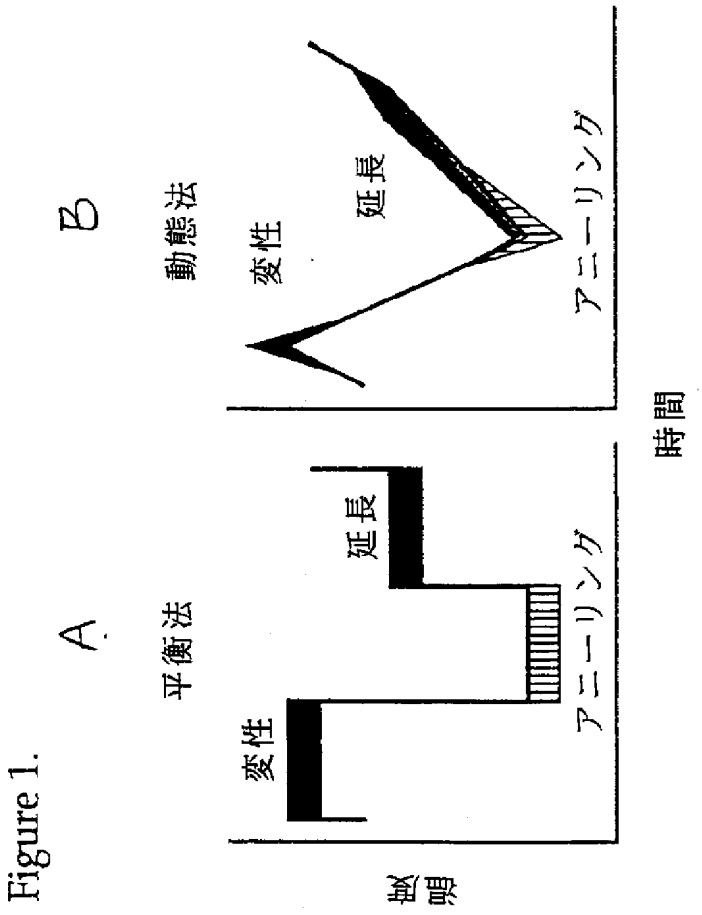
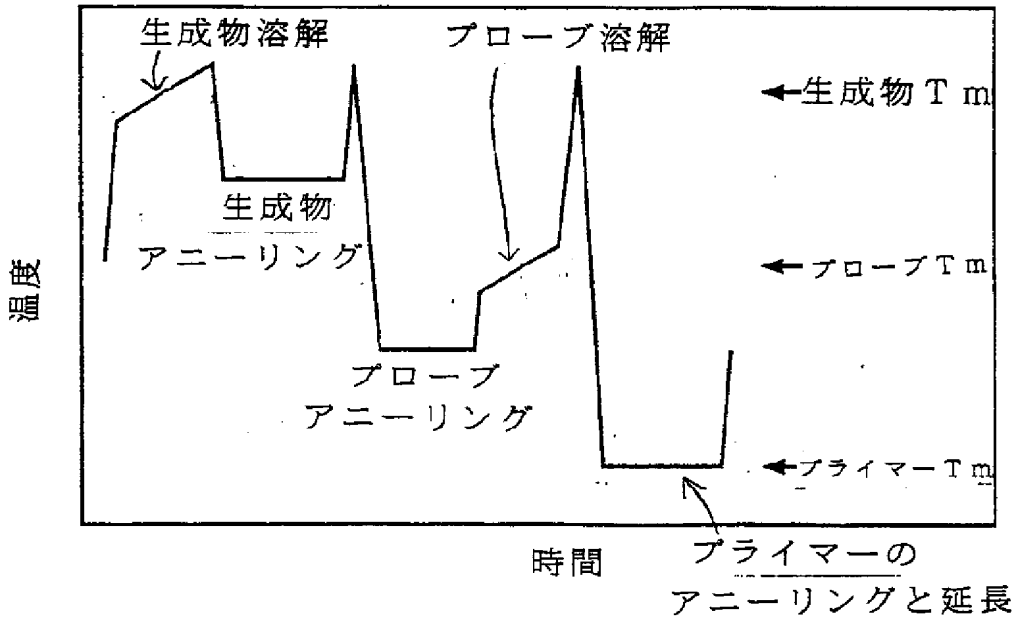


Figure 1.

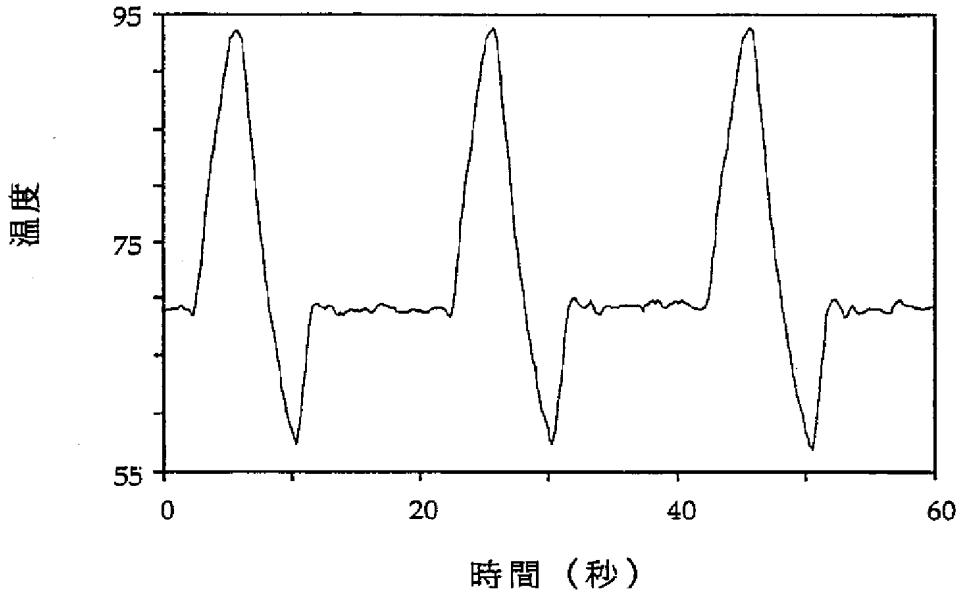
【図２】

Figure 2.


生成物溶解
プローブ溶解
生成物Ｔｍ
生成物
アニーリング
プローブＴｍ
温度
プローブ
アニーリング
プライマーＴｍ
時間
プライマーの
アニーリングと延長

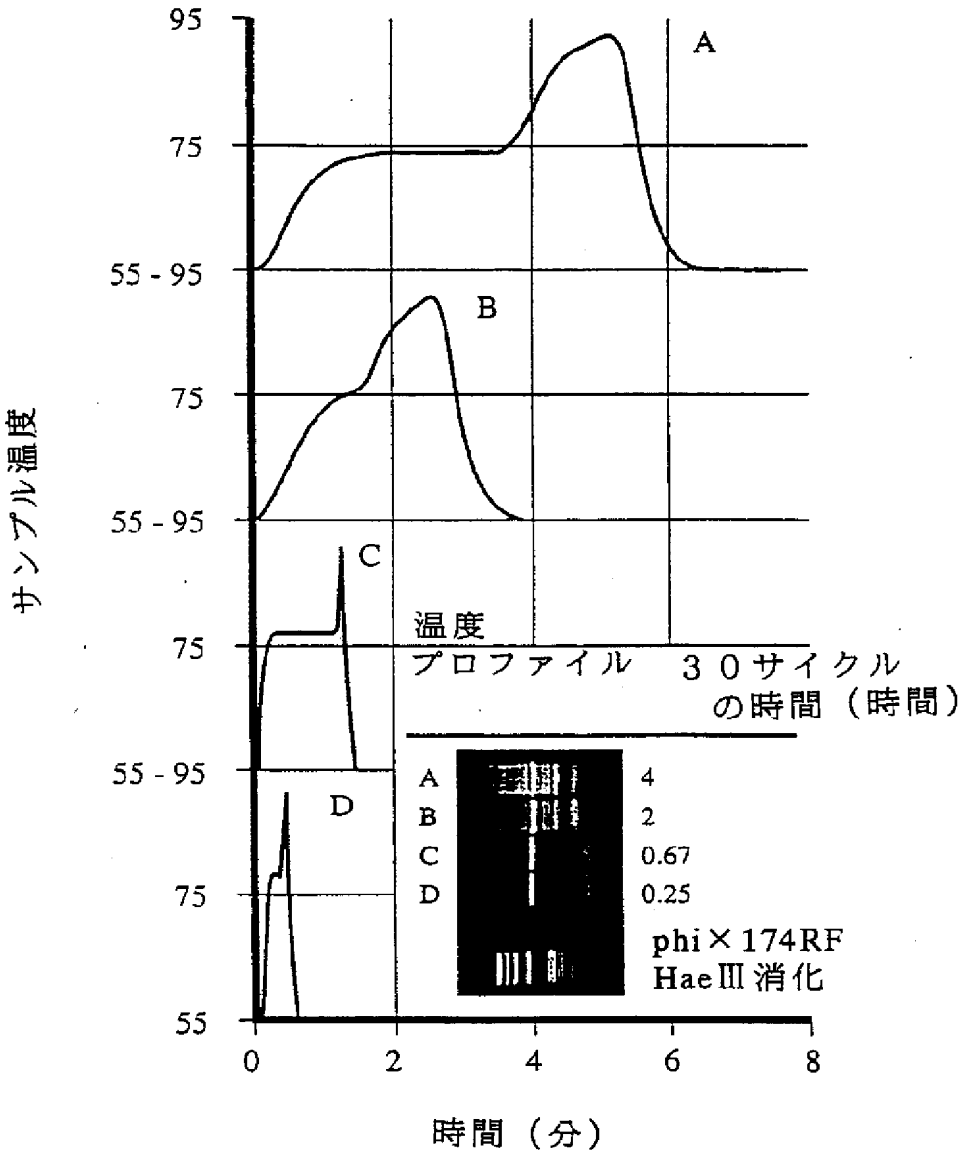
【図３】

FIGURE 3.



【図４】

Figure 4.

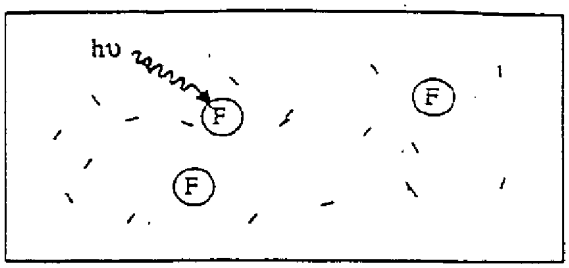

95
75
55 - 95
75
55 - 95
75
55 - 95
75
55
A
B
C
D
サンプル温度
温度
プロファイル
３０サイクル
の時間（時間）
A
B
C
D
4
2
0.67
0.25
phi×174RF
HaeⅢ消化
0
2
4
6
8
時間（分）

【図５】

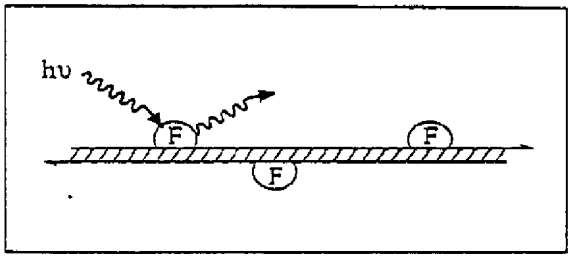
Figure 5.

A. 二重鎖ＤＮＡによる蛍光の増加

・ 増幅前の極小蛍光

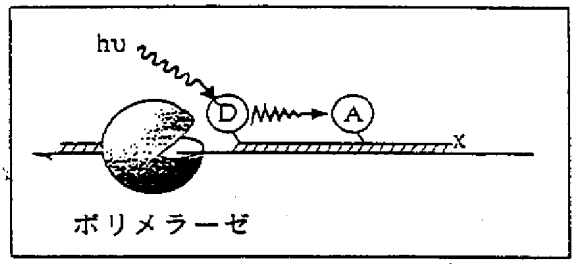


・ 増加後の蛍光増加

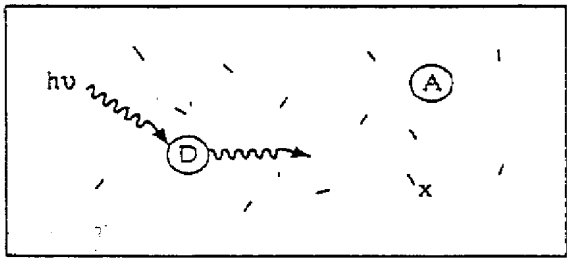


B. 水解による消光からの解離

・受容体による供与体の消光

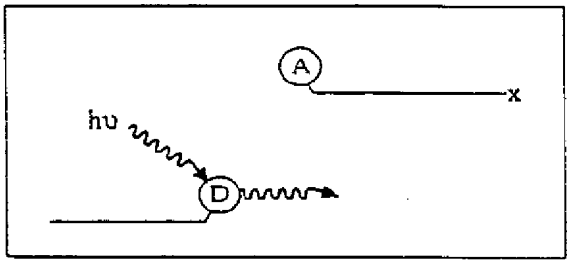


・ 水解後の供与体蛍光増加

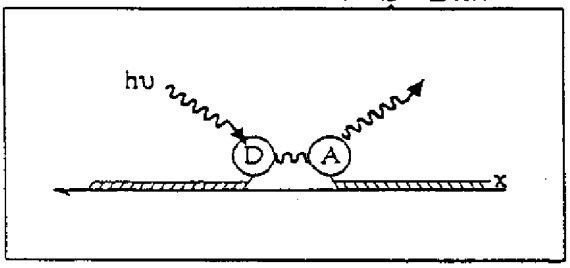


C. ハイブリダイゼーションによる共鳴エネルギー転移増加

・ 基線供与体蛍光

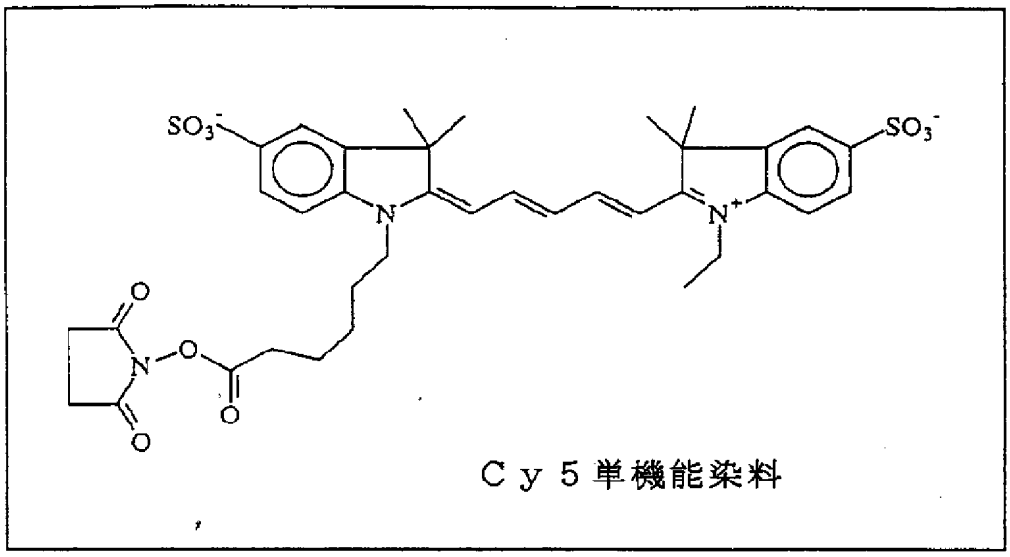


・受容体への供与体転移増加



【図６】

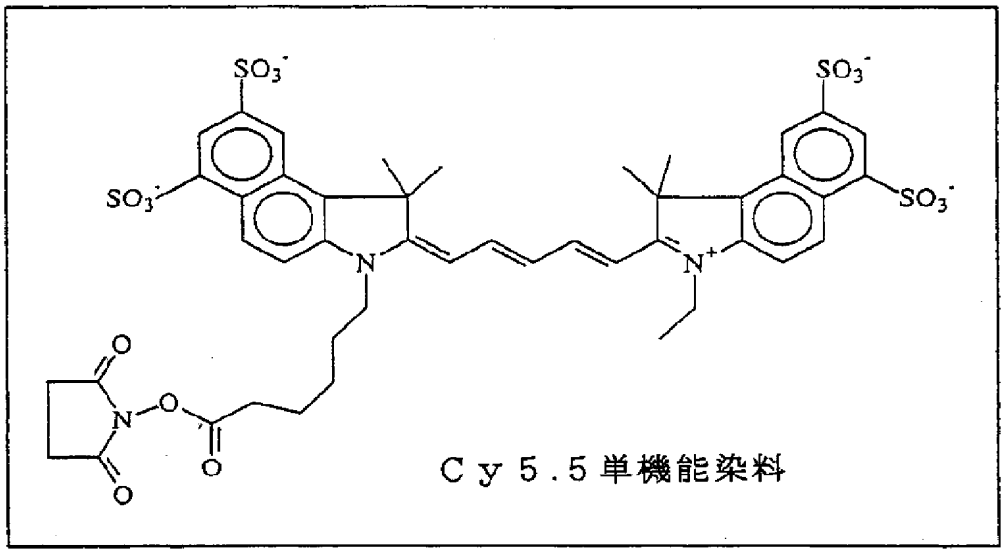
Figure 6.



Ｃｙ５単機能染料

【図７】

Figure 7.



Ｃｙ５．５単機能染料

【図８】

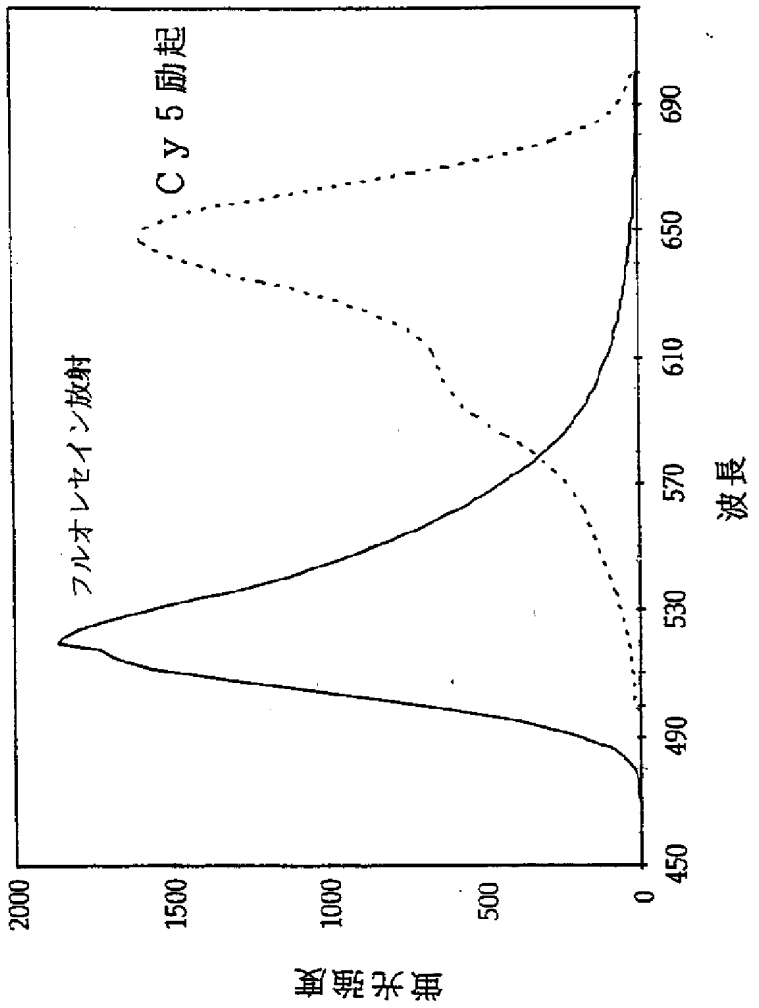
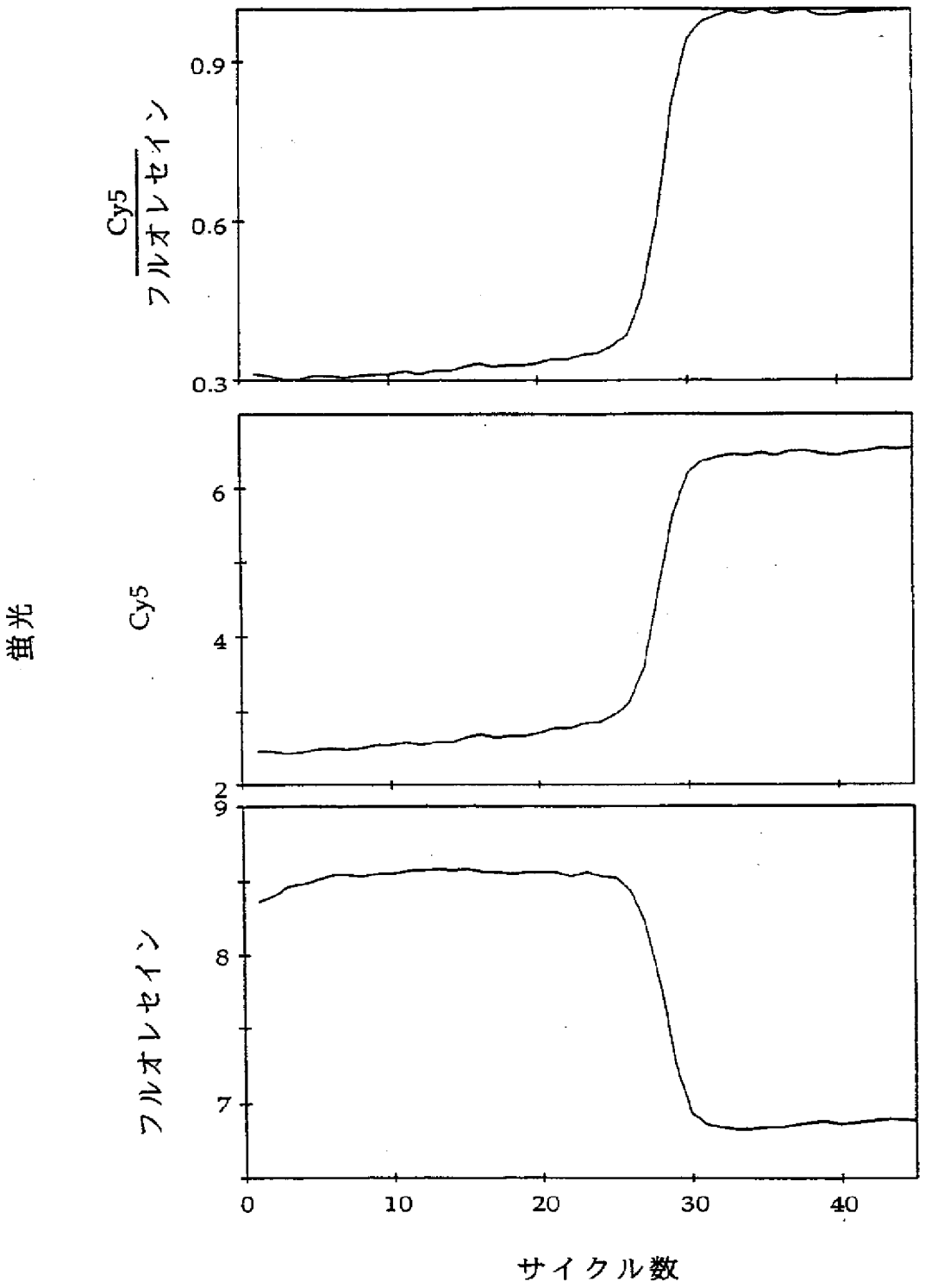

Ｃｙ５励起
フルオレセイン放射
蛍光強度
2000
1500
1000
500
0
450
490
530
570
610
650
690
波長

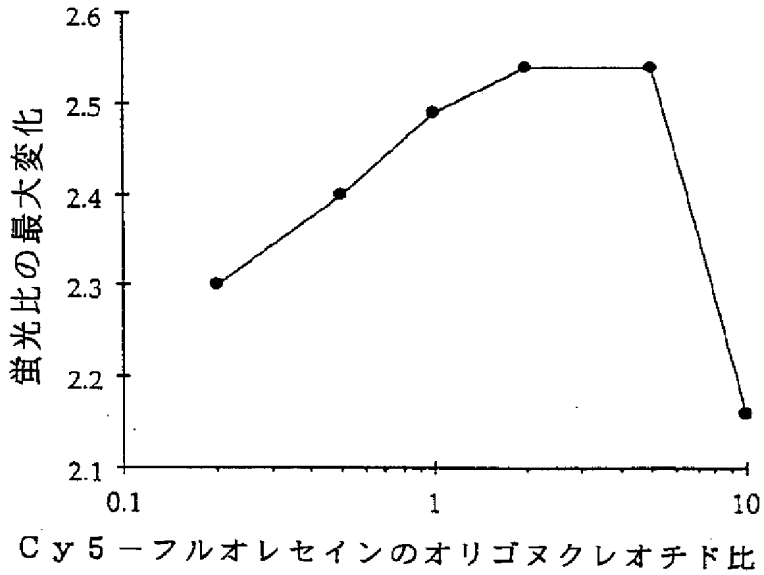
Figure 8.

【図９】



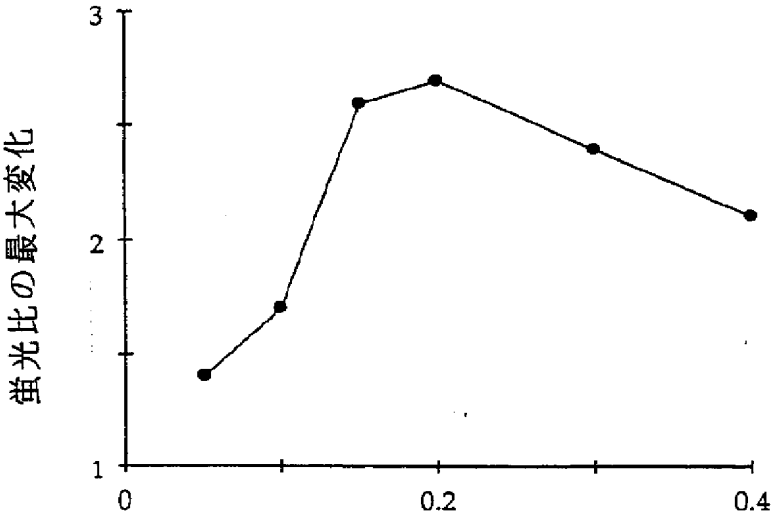
【図１０】

Figure 10.



【図１１】

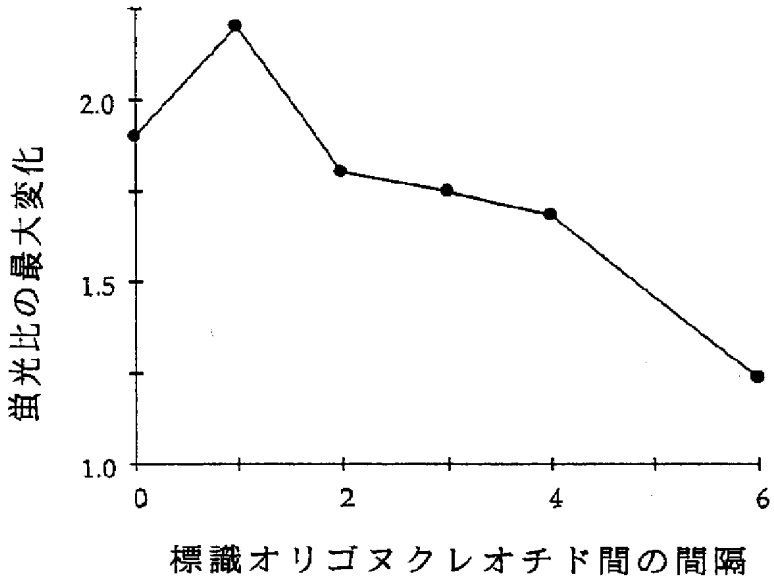
Figure 11.



２：１Ｃｙ５：フルオレセイン比での
フルオレセイン・オリゴヌクレオチド濃度（μＭ）

【図１２】

Figure 12.



【図１３】

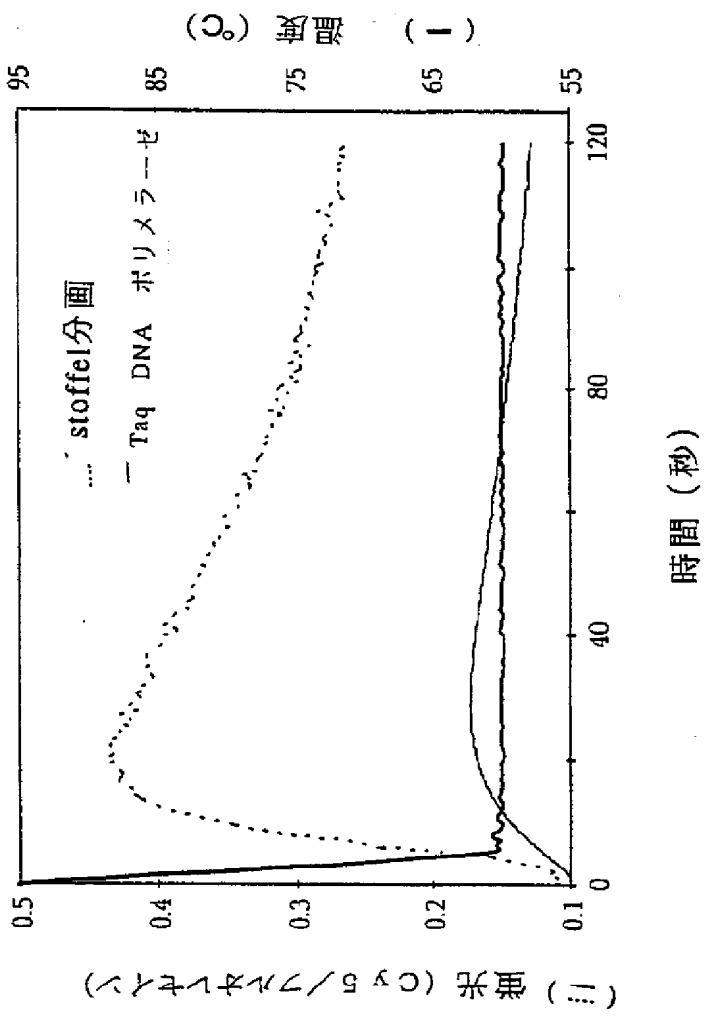
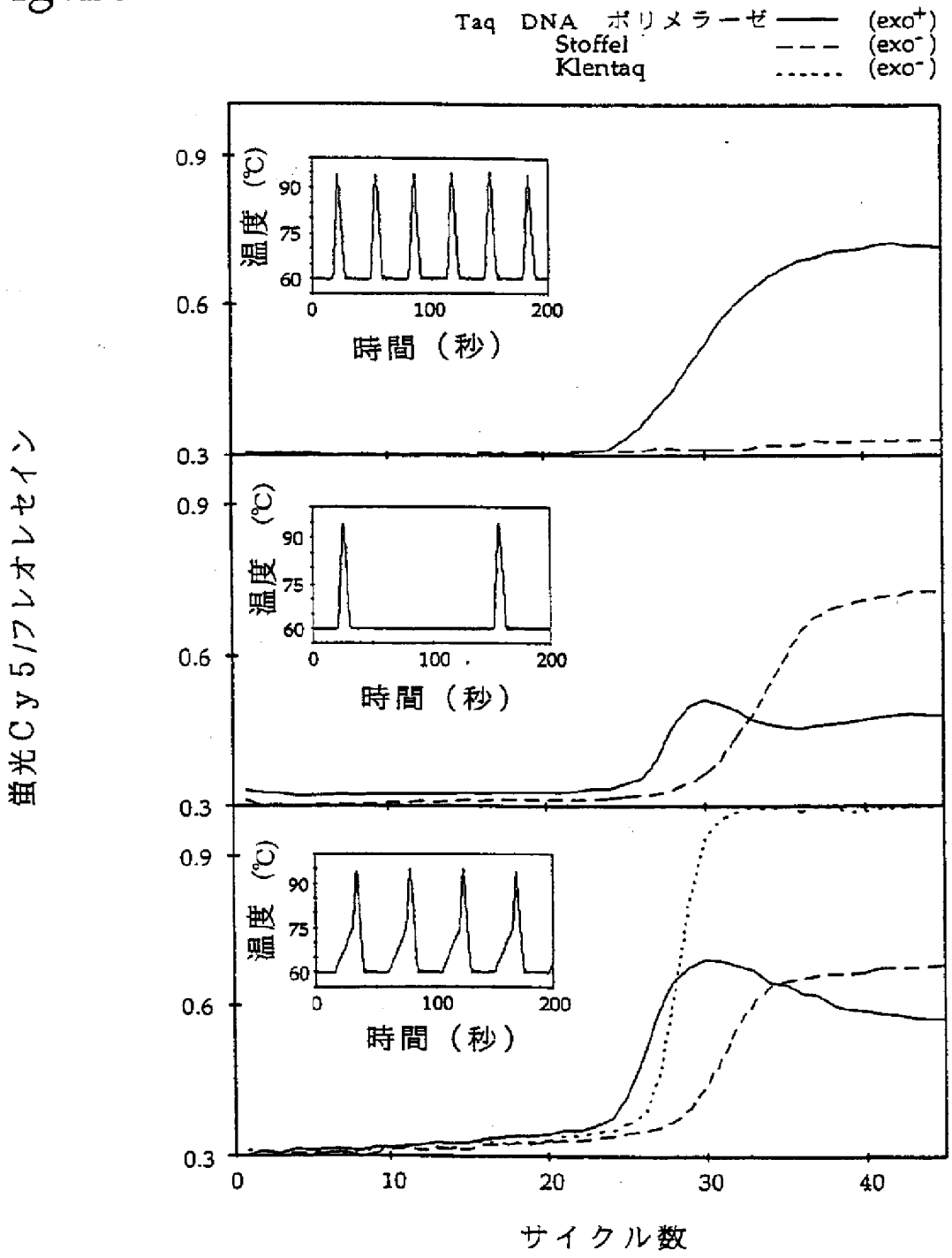


Figure 13.

【図１４】

Figure 14.



【図１５】

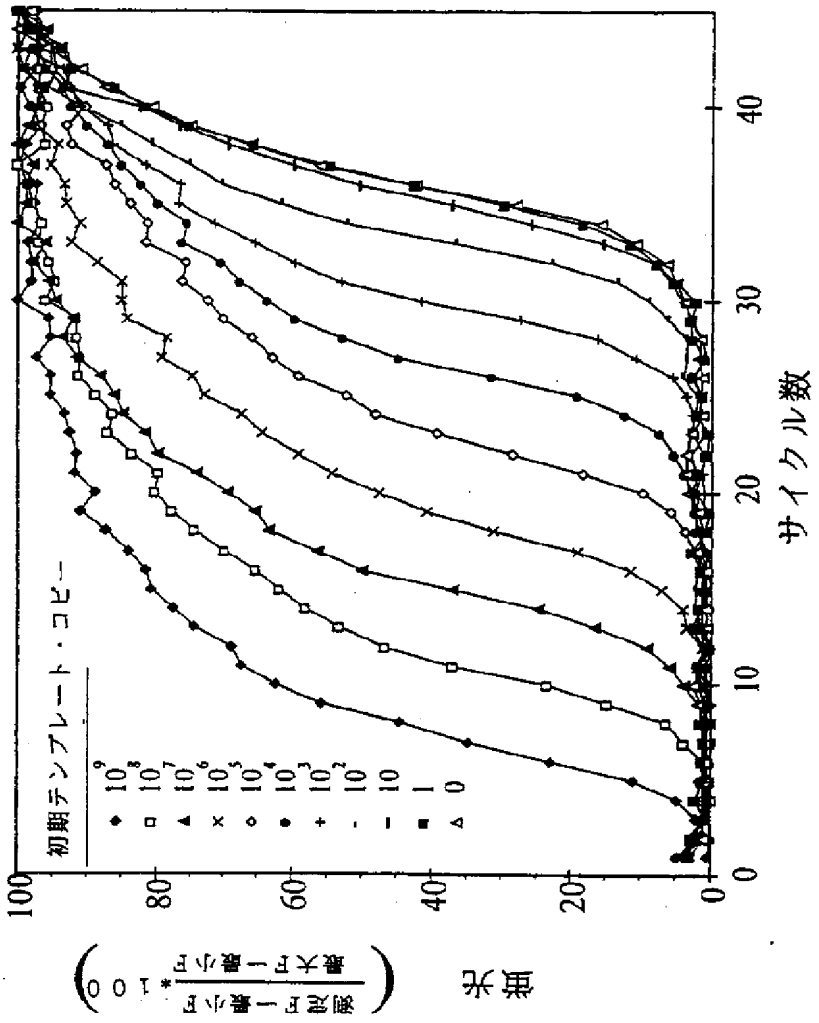
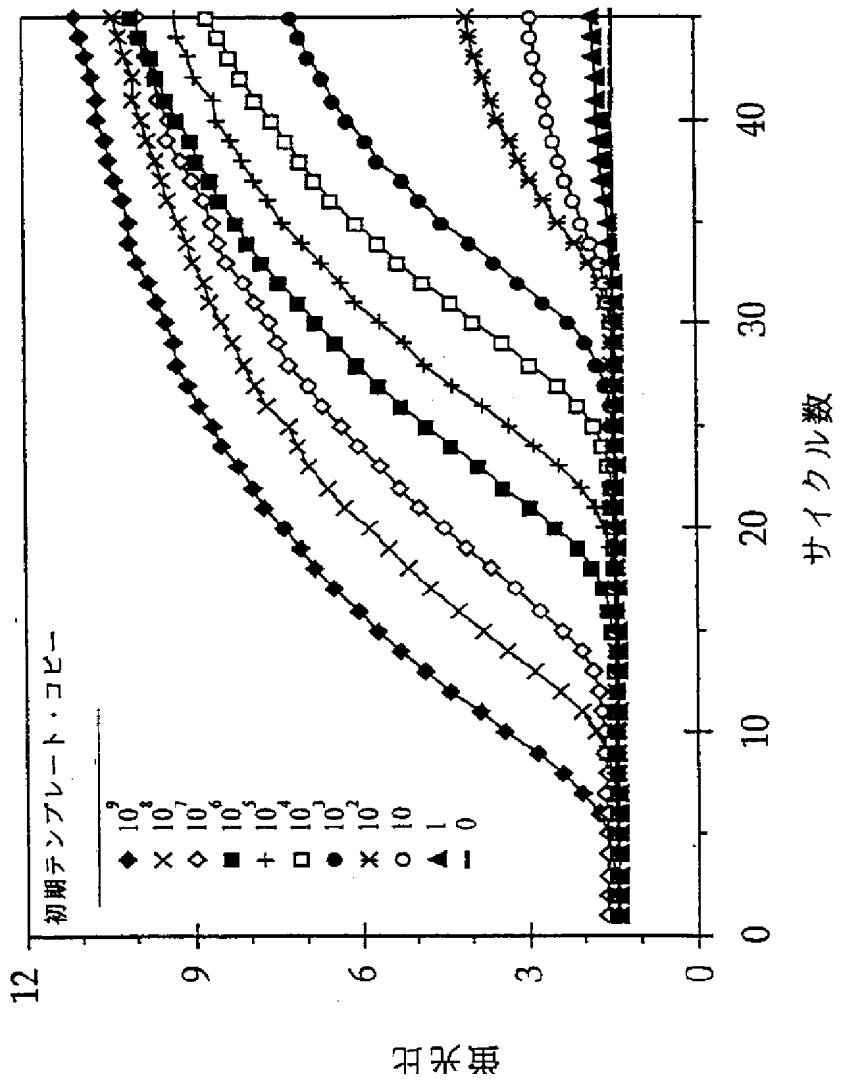


Figure 15.

【図１６】

Figure 16.



【図１７】

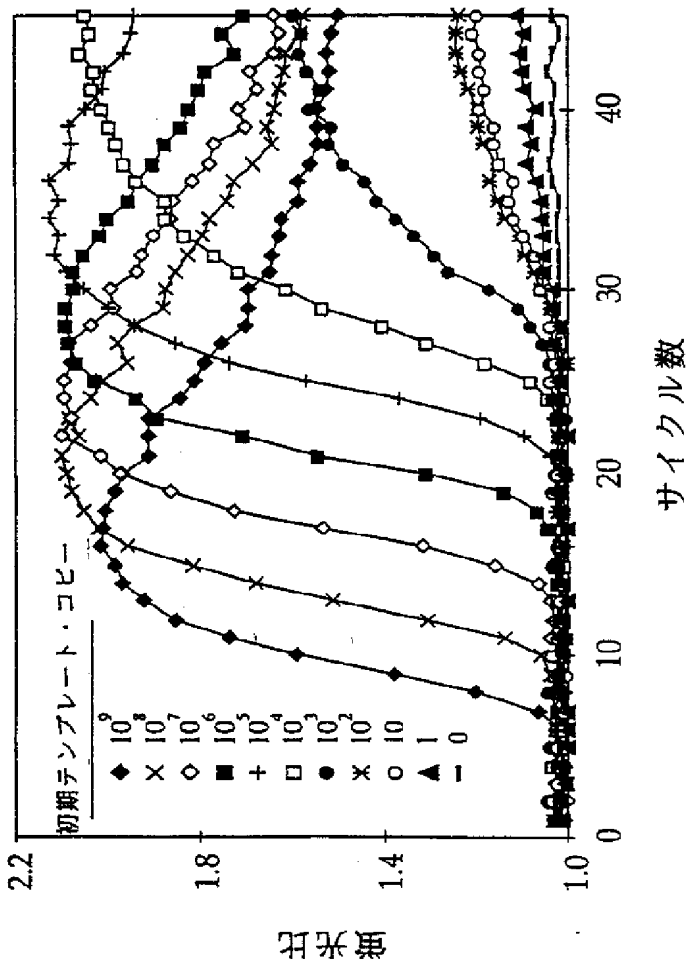
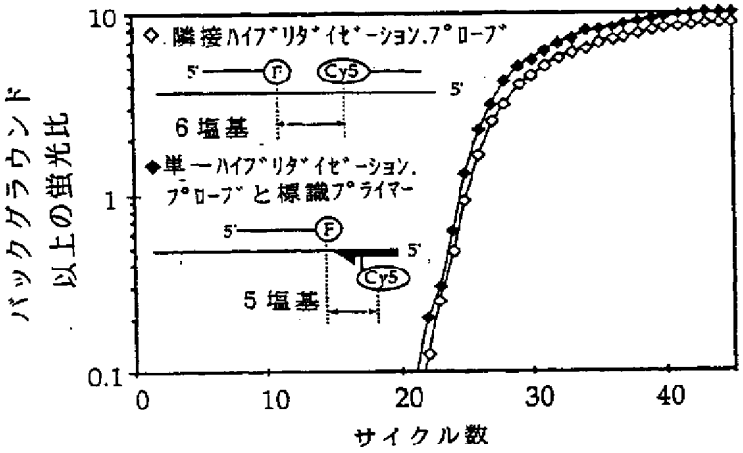


Figure 17.

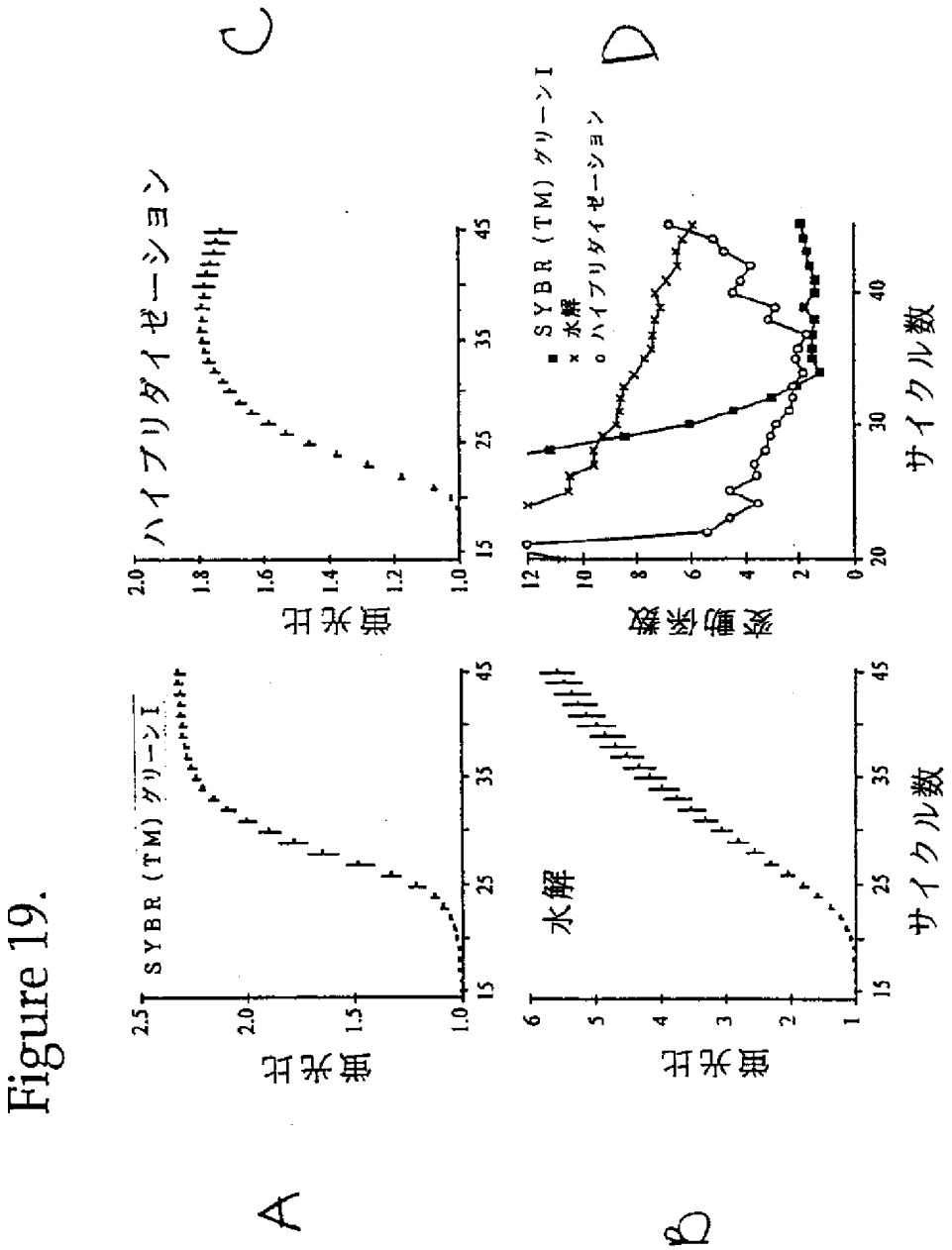
【図１８】

Figure 18.



【図１９】

Figure 19.



【図２０】

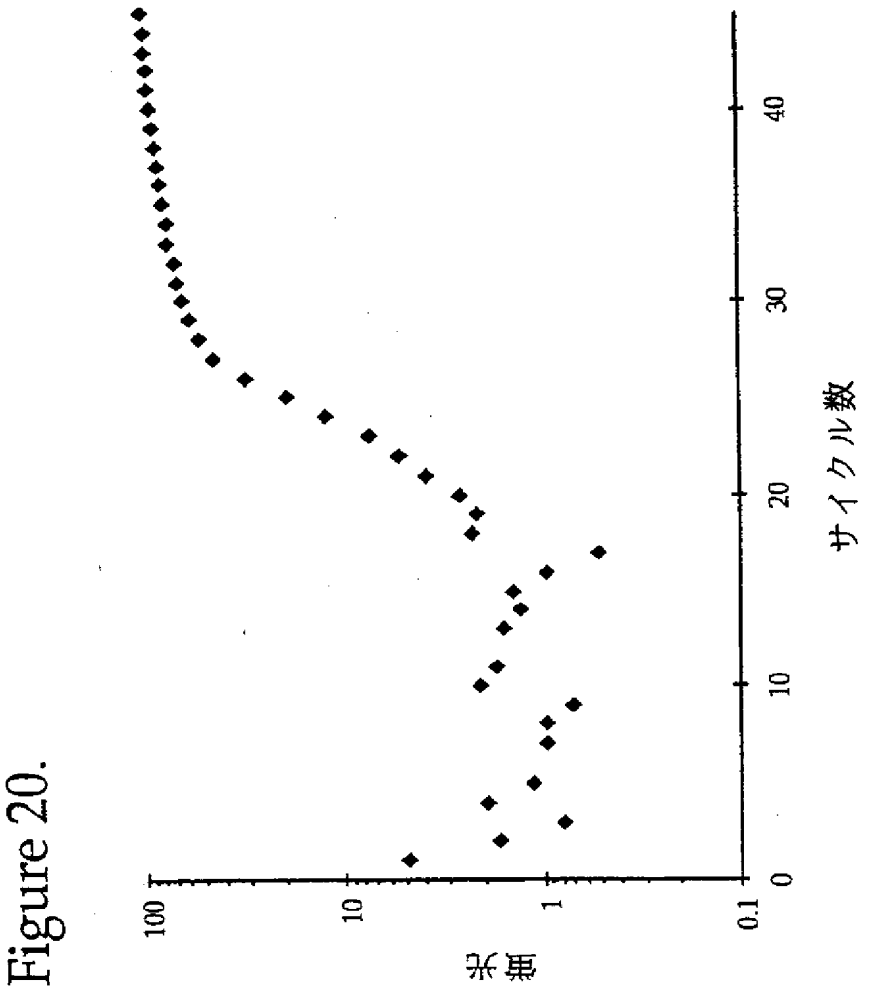
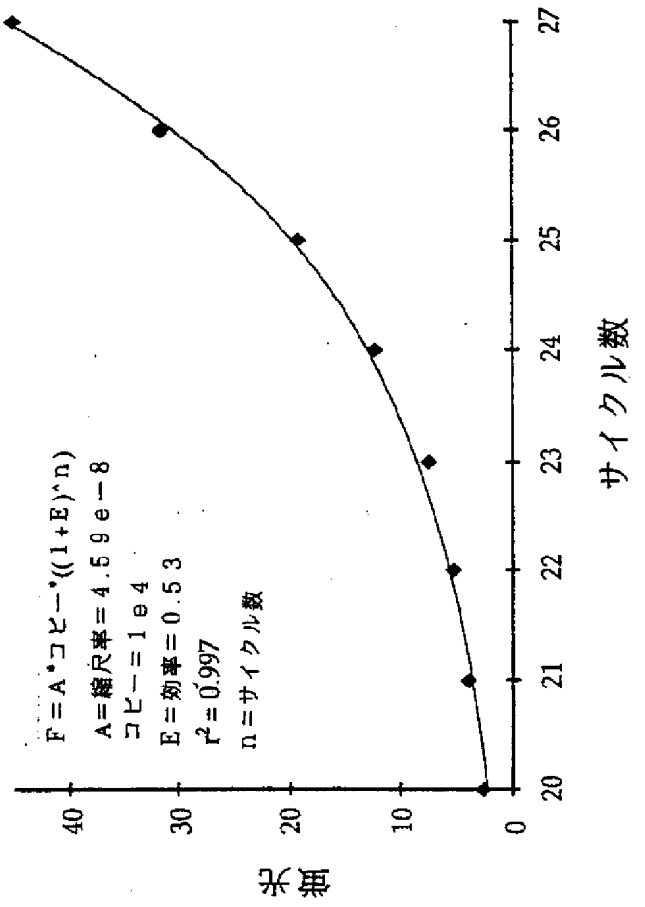


Figure 20.

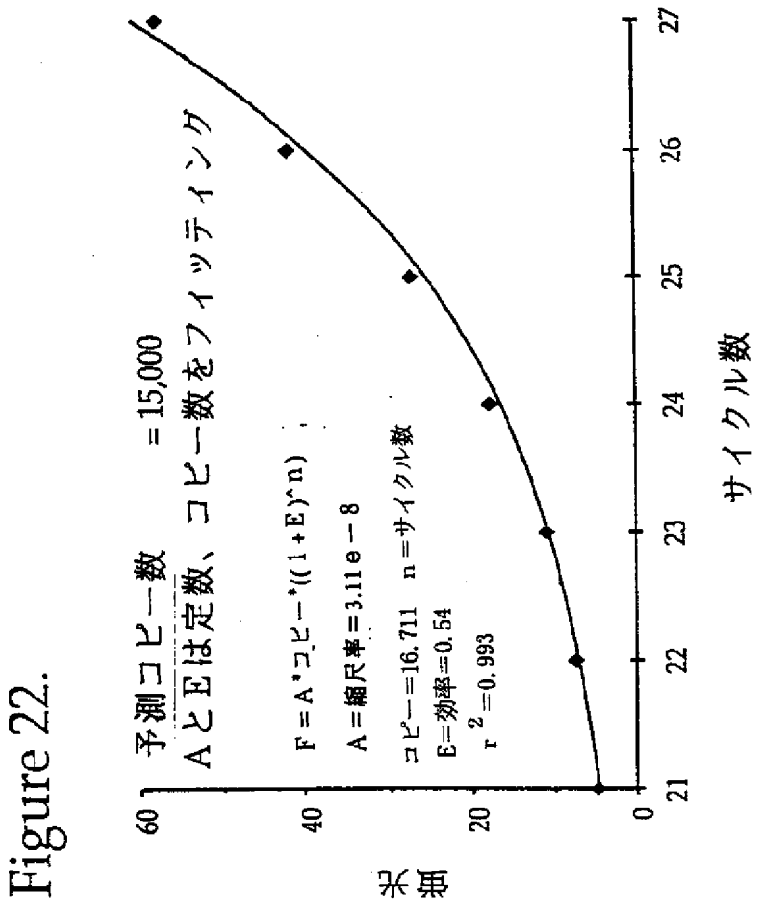
【図２１】

Figure 21.



【図２２】

Figure 22.



【図２３】

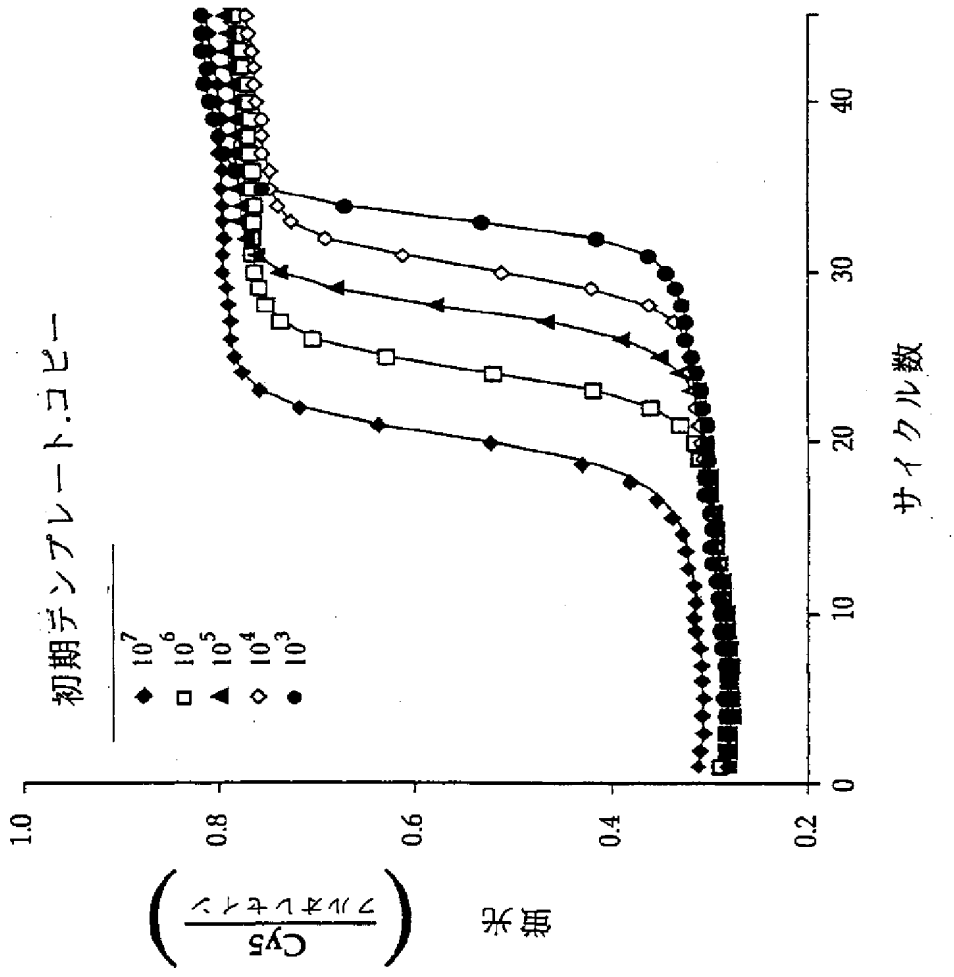
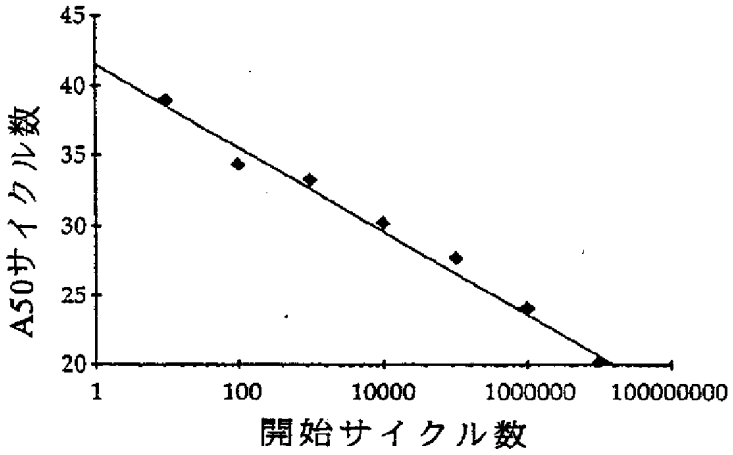


Figure 23.

【図２４】

Figure 24.



【図２５】

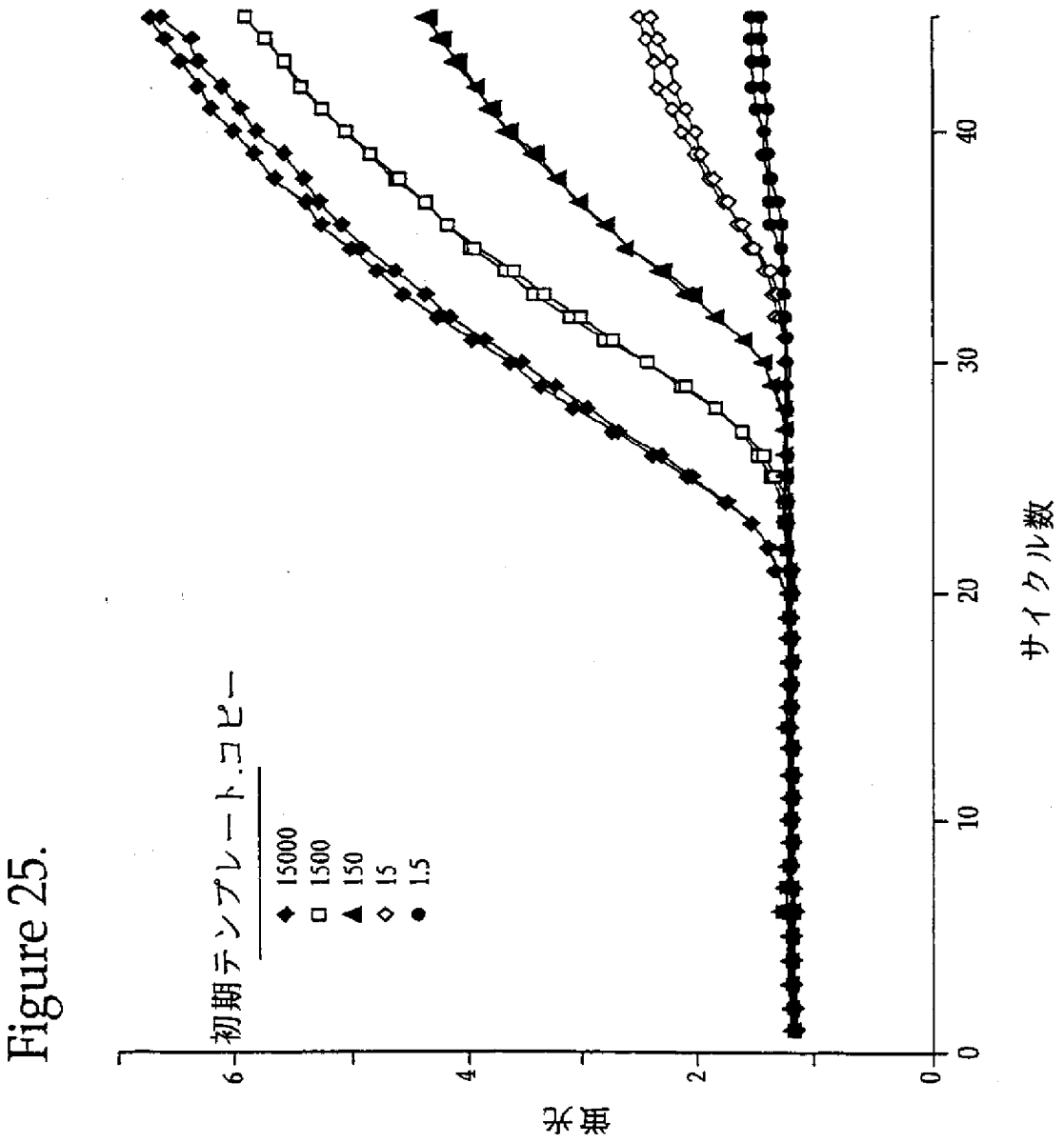


Figure 25.

【図２６】

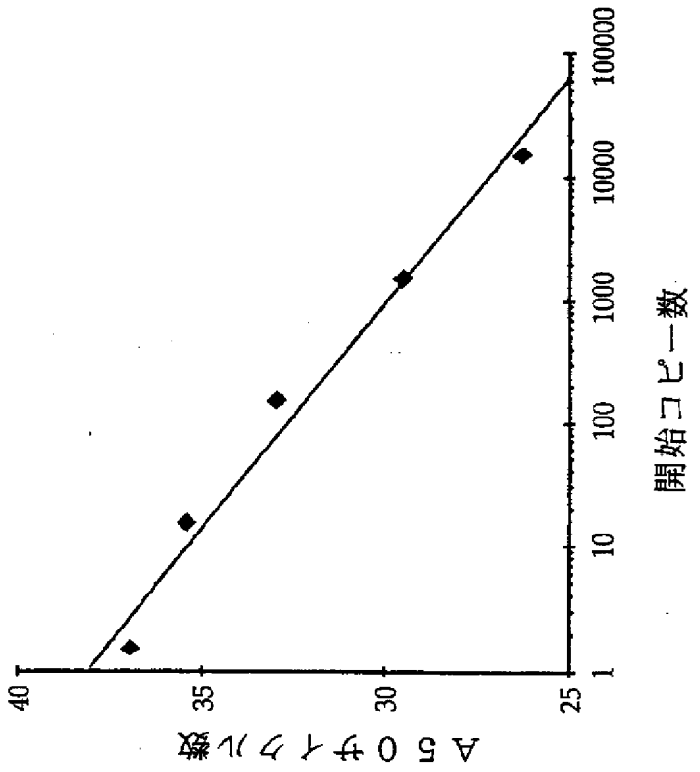


Figure 26.

【図２７】

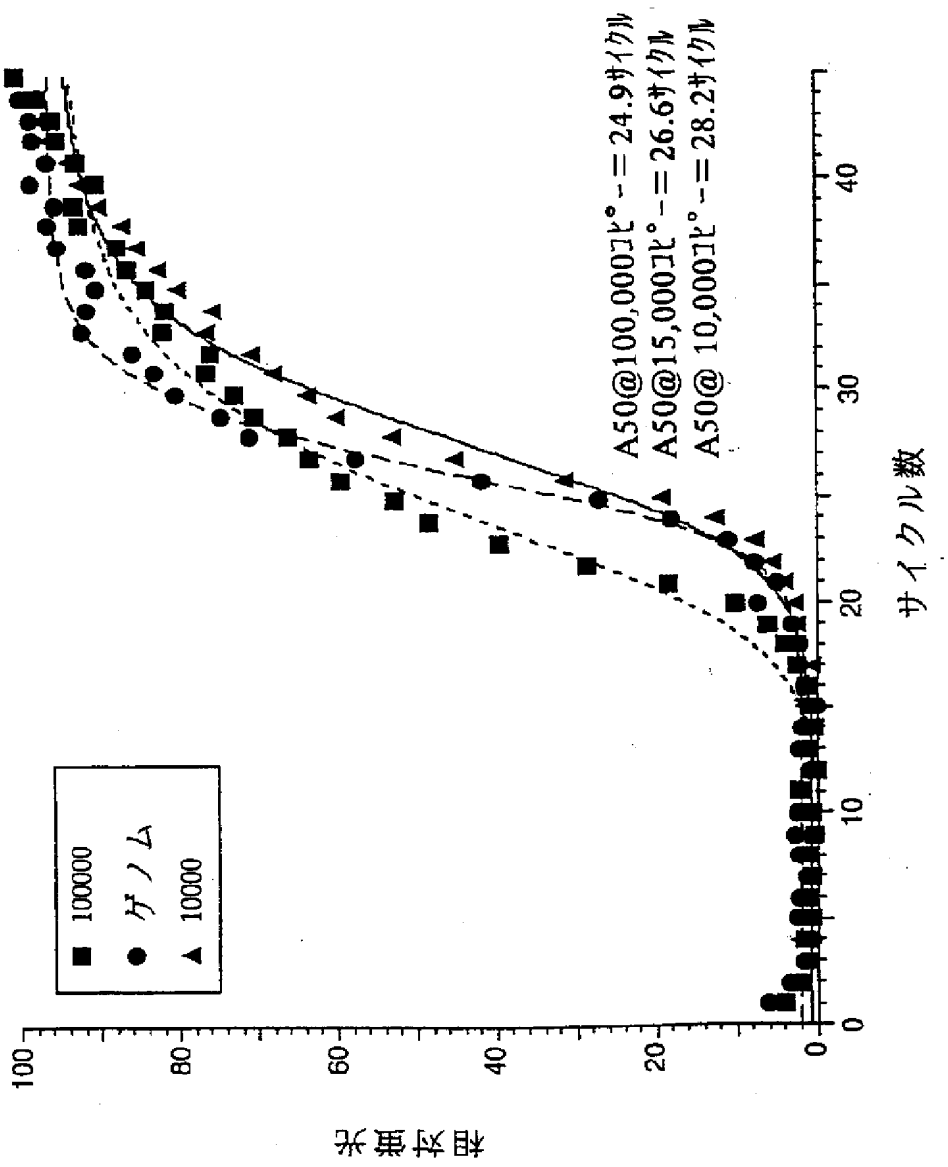
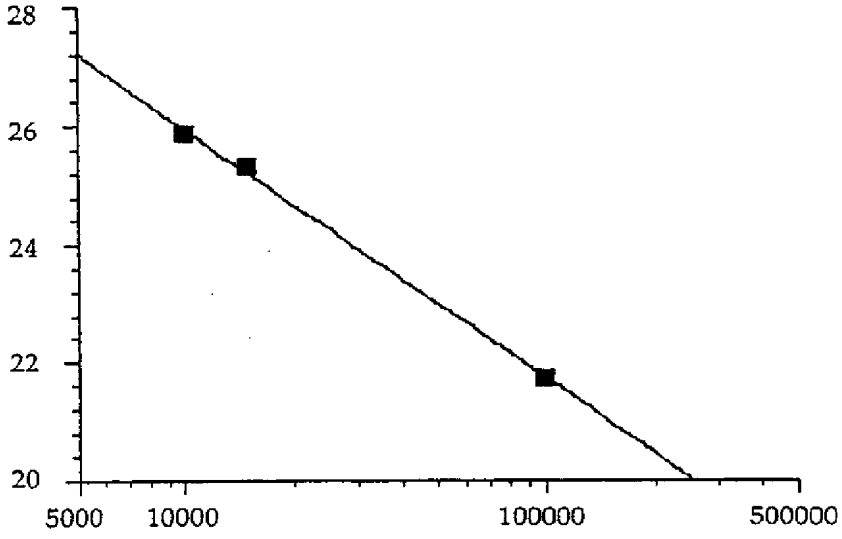


Figure 27.

【図２８】

Figure 28.

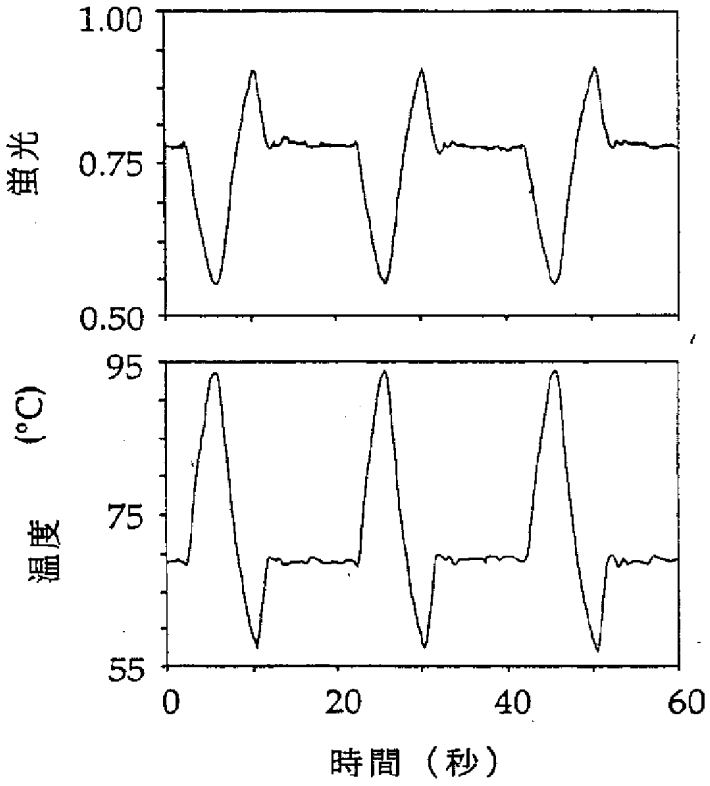


【図２９】

Figure 29.

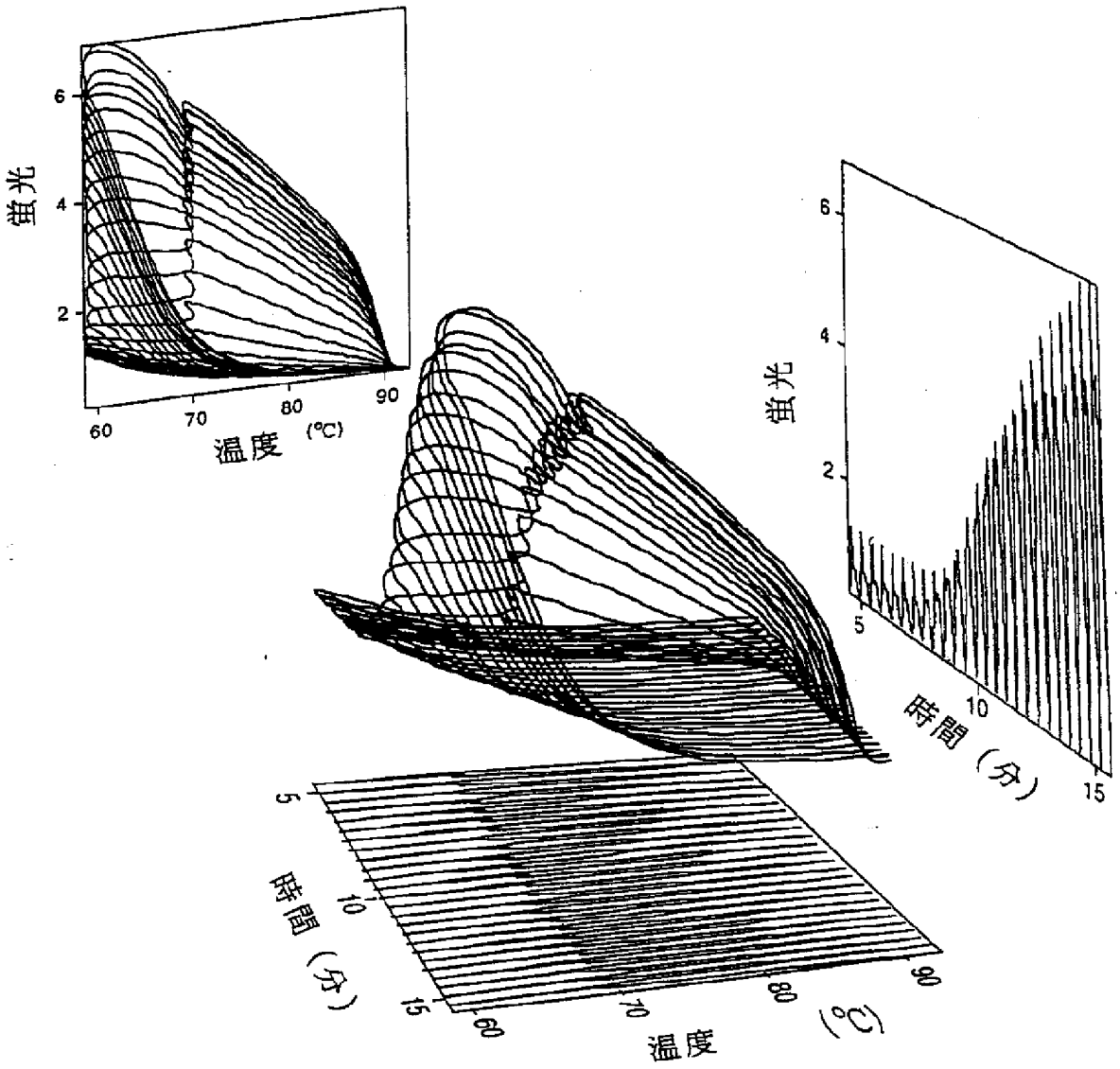
A

B



【図３０】

Figure 30



【図３１】

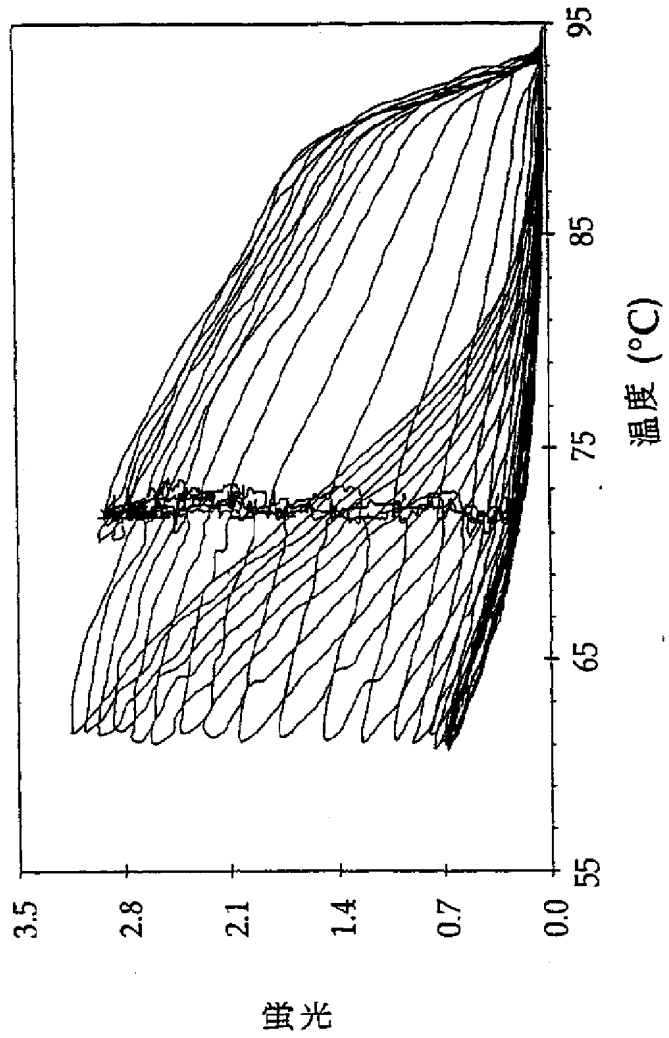


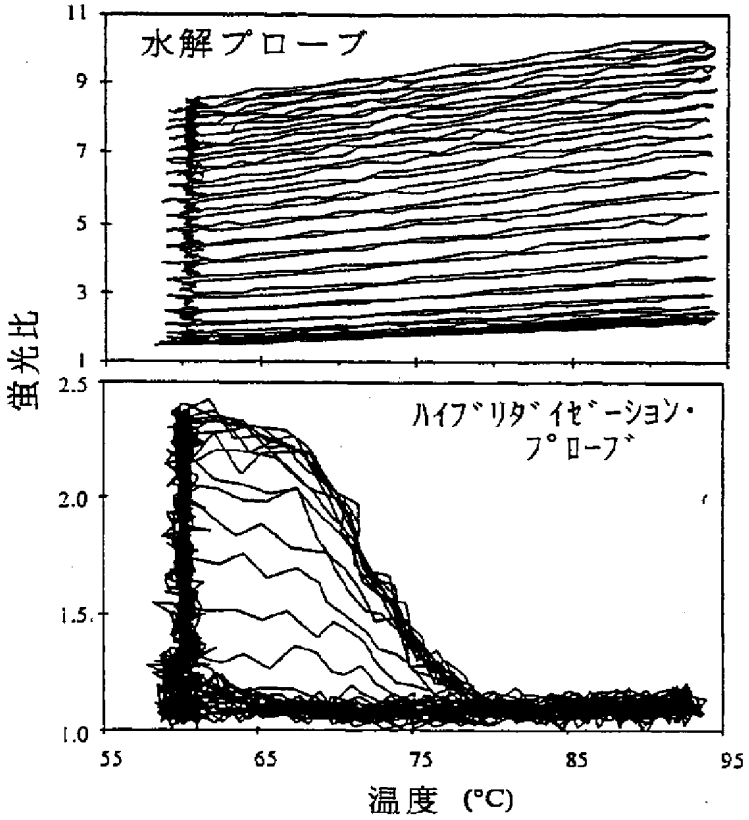
Figure 31.

【図３２】

Figure 32.

A

B



【図３３】

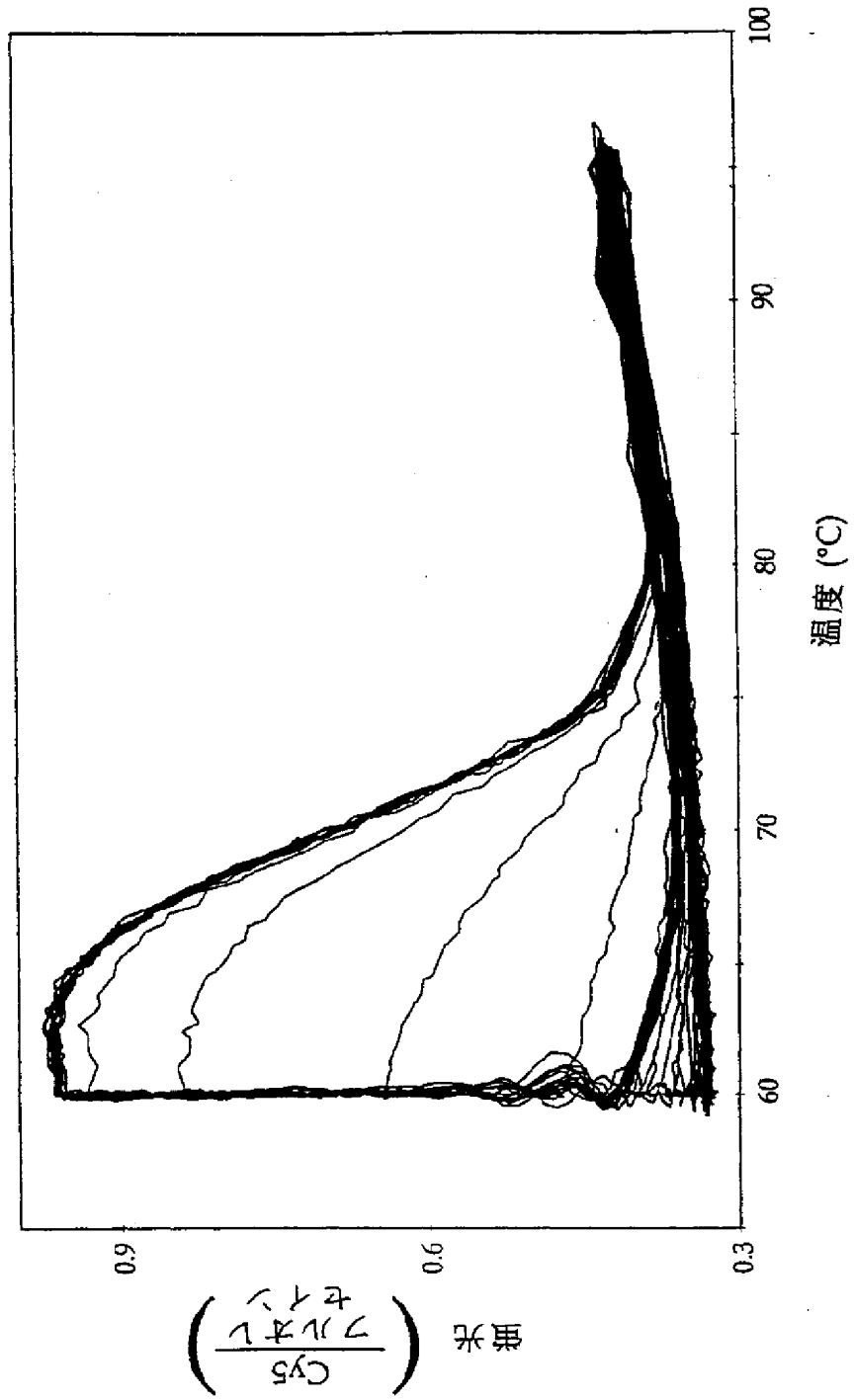


Figure 33.

【図３４】

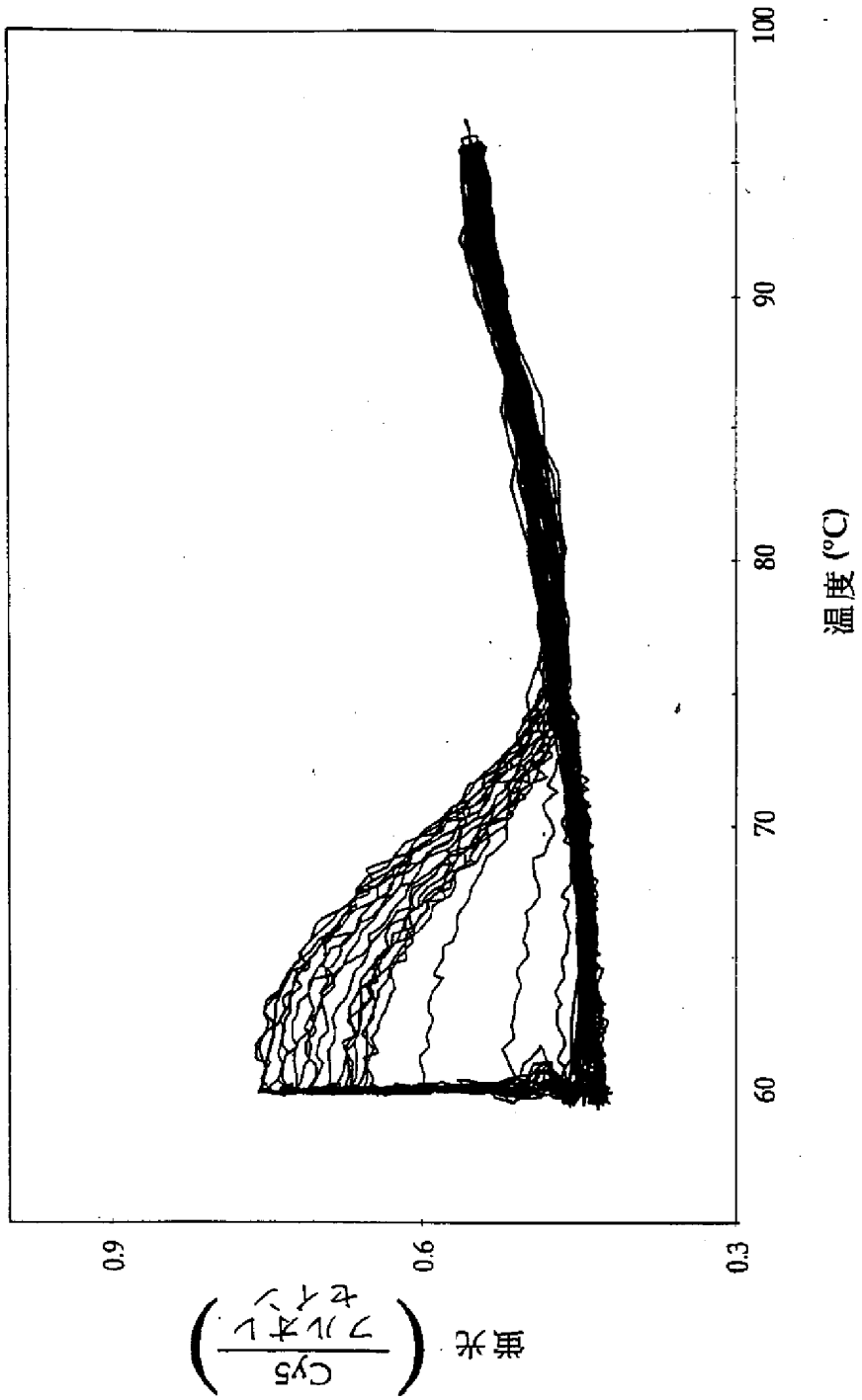


Figure 34.

【図３５】

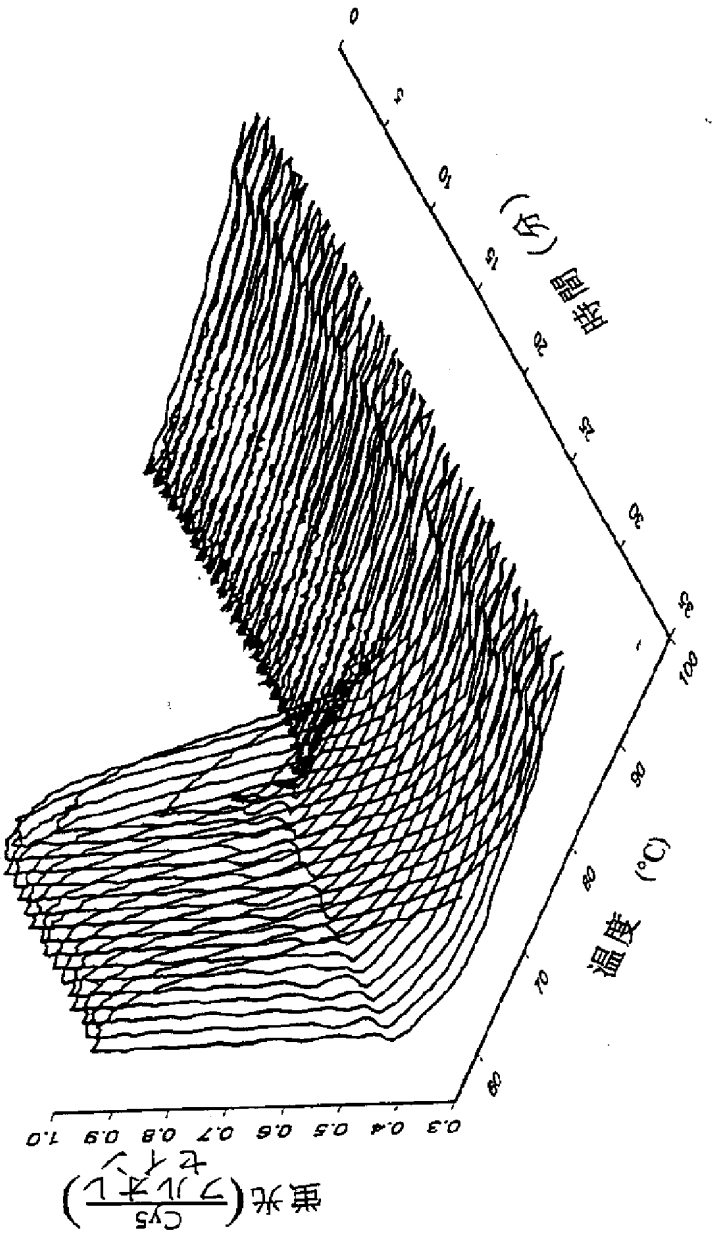


Figure 35.

【図３６】

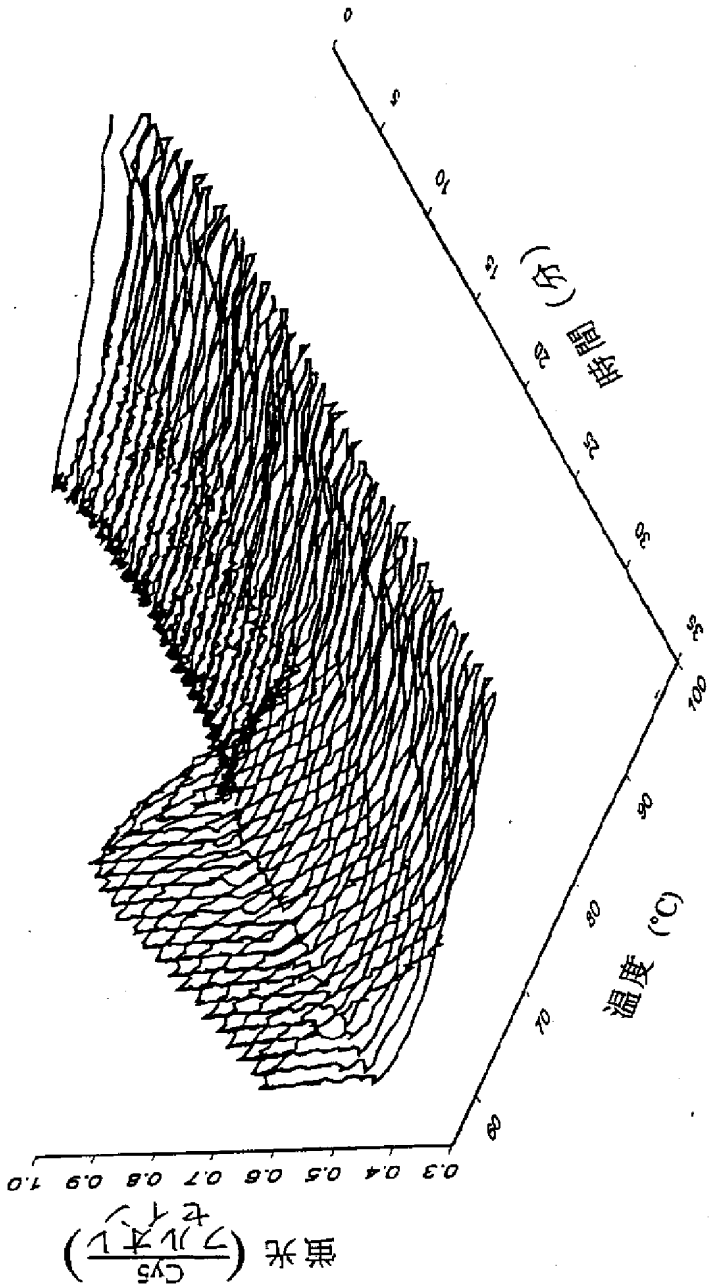
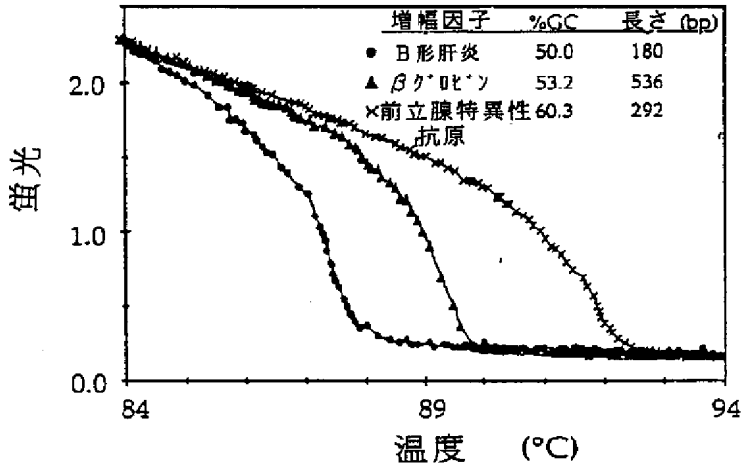


Figure 36.

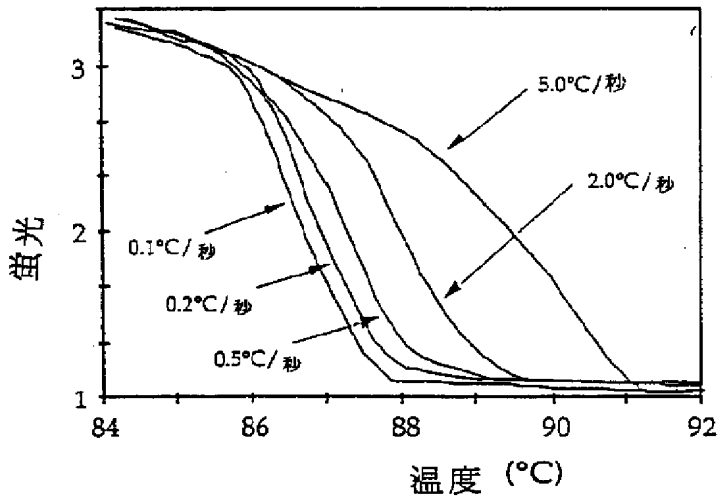
【図３７】

Figure 37



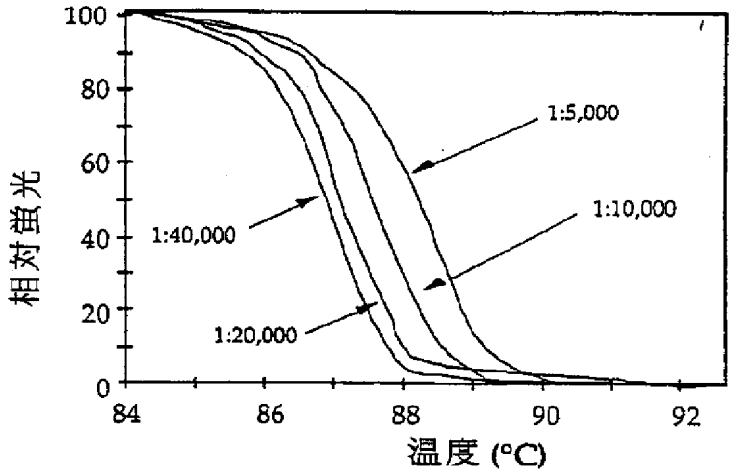
【図３８】

Figure 38



【図３９】

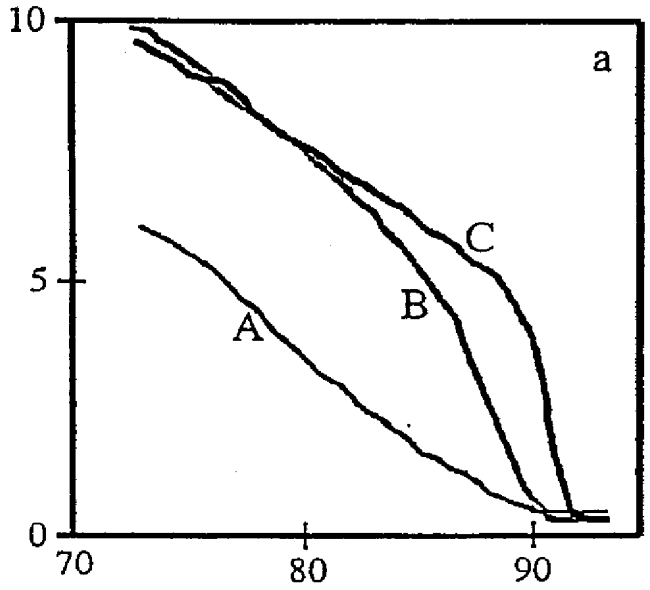
Figure 39



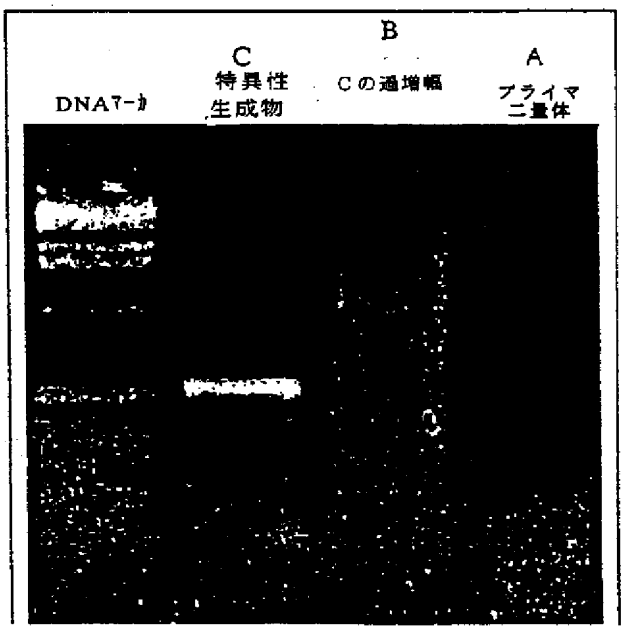
【図４０】

Figure 40

A



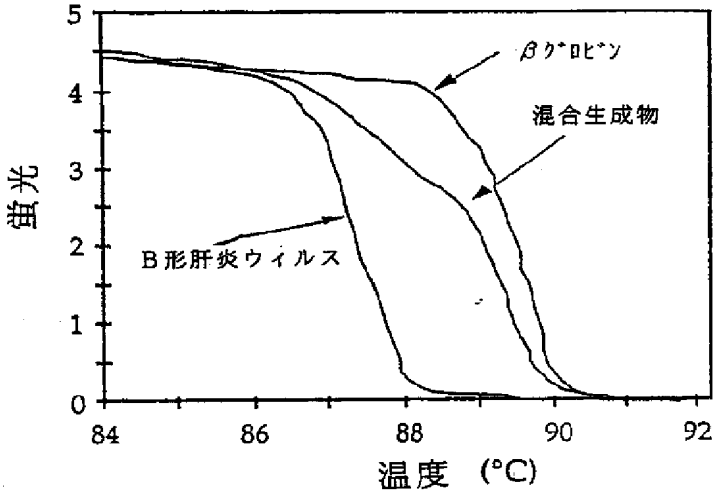
B



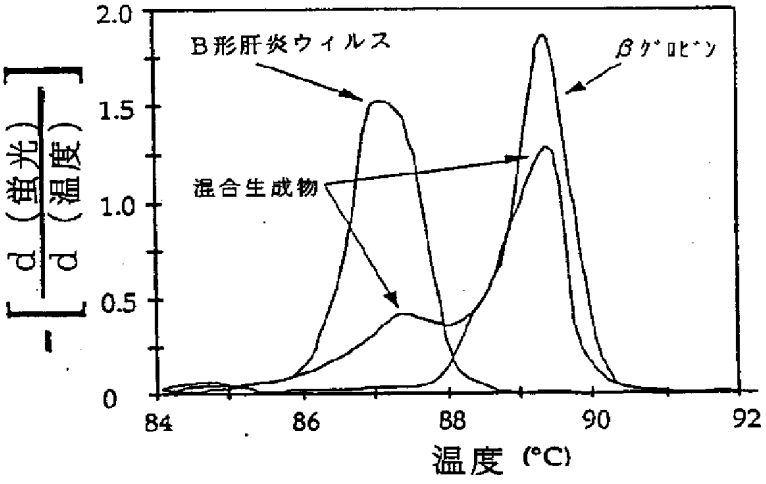
【図４１】

Figure 41

A

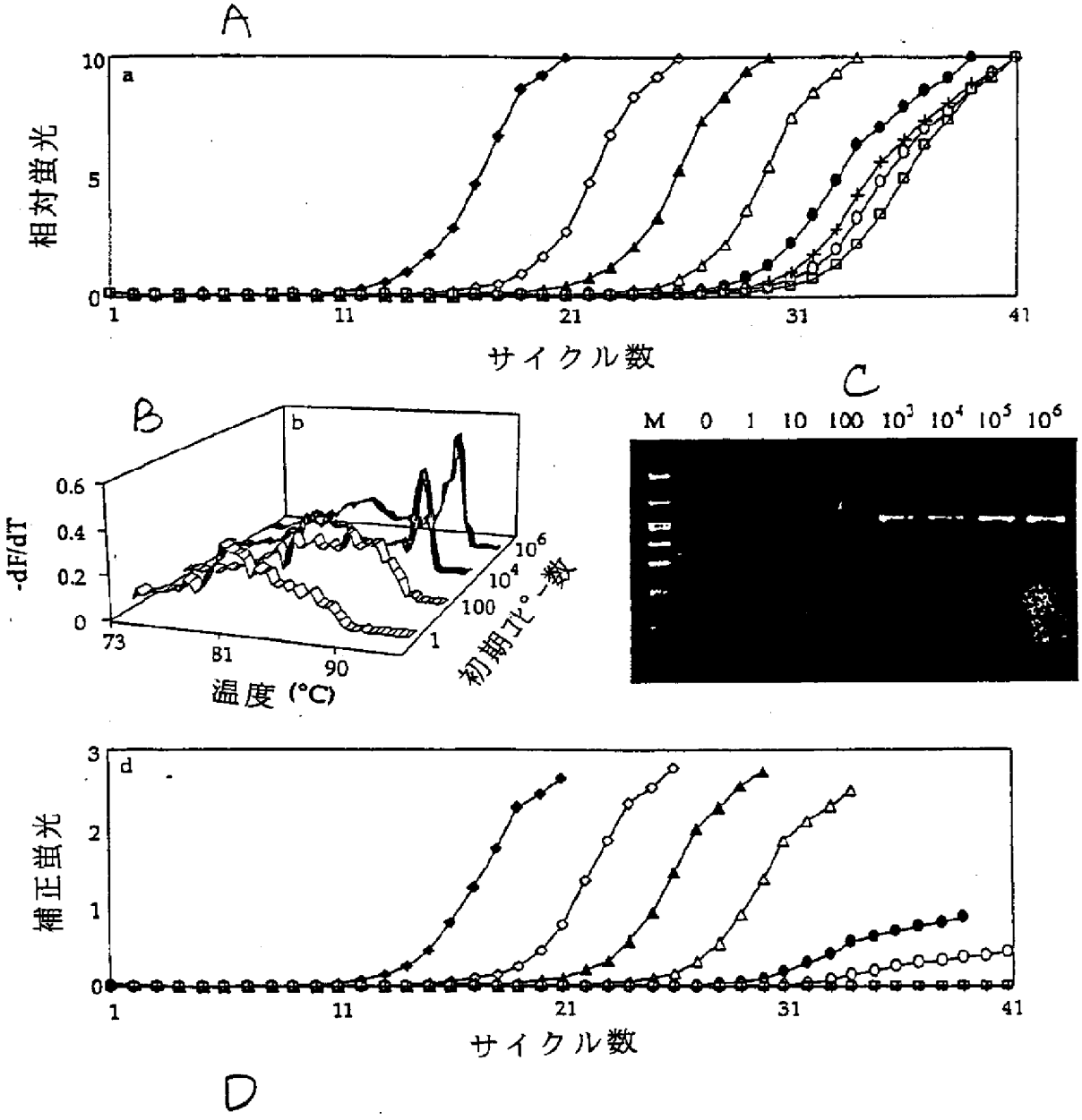


B



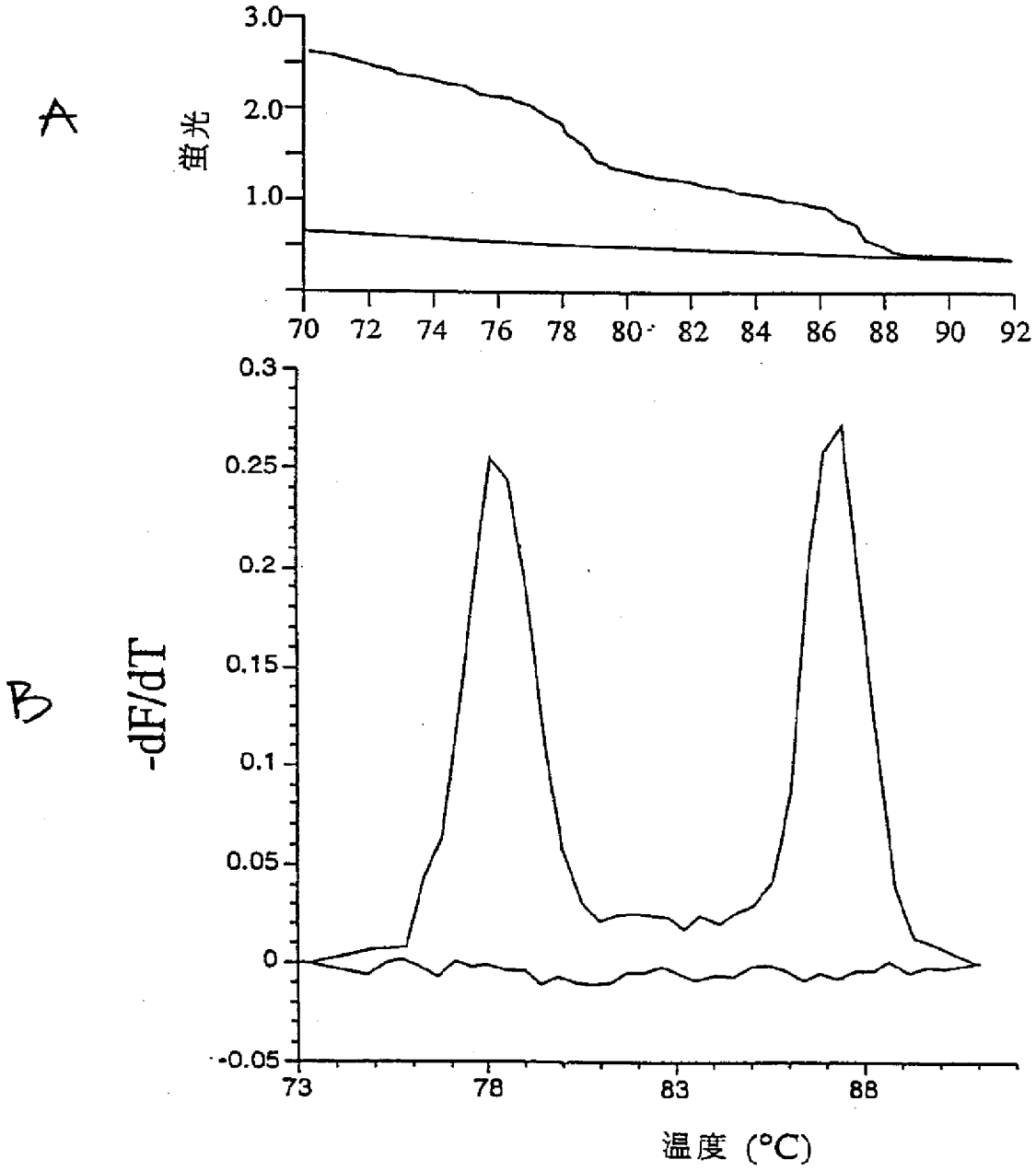
【図４２】

Figure 42



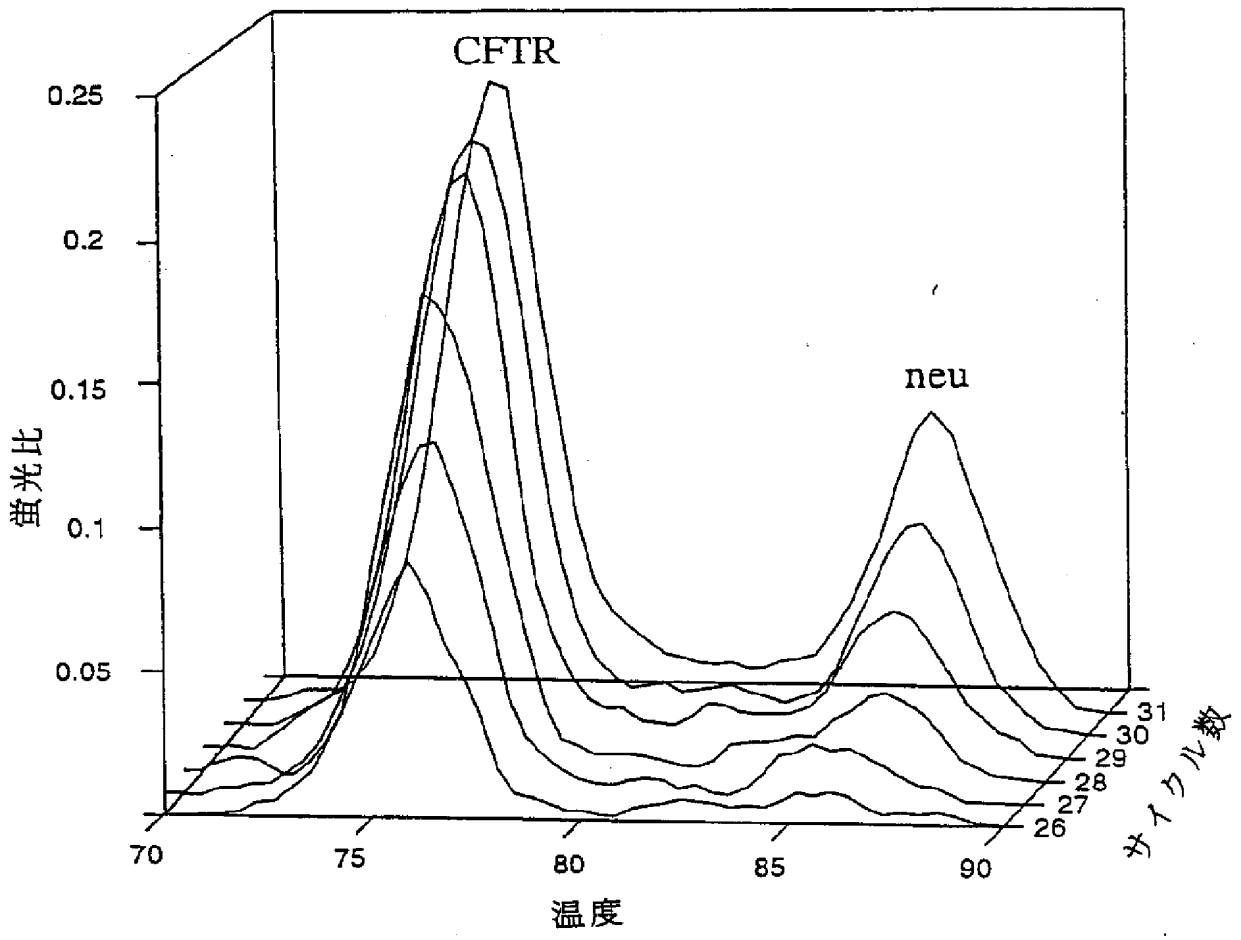
【図４３】

Figure 43



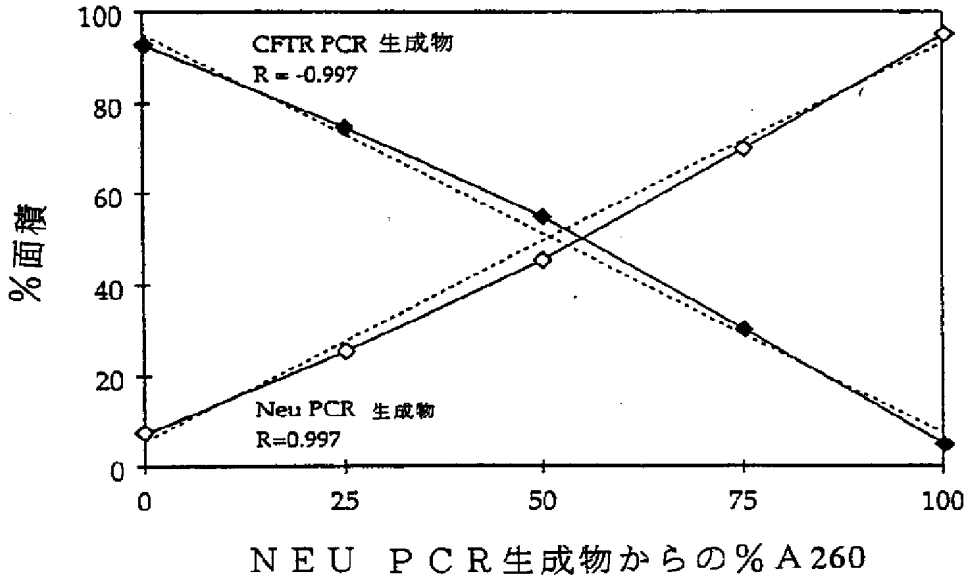
【図４４】

Figure 44



【図４５】

Figure 45



【図４６】

FIG. 46A

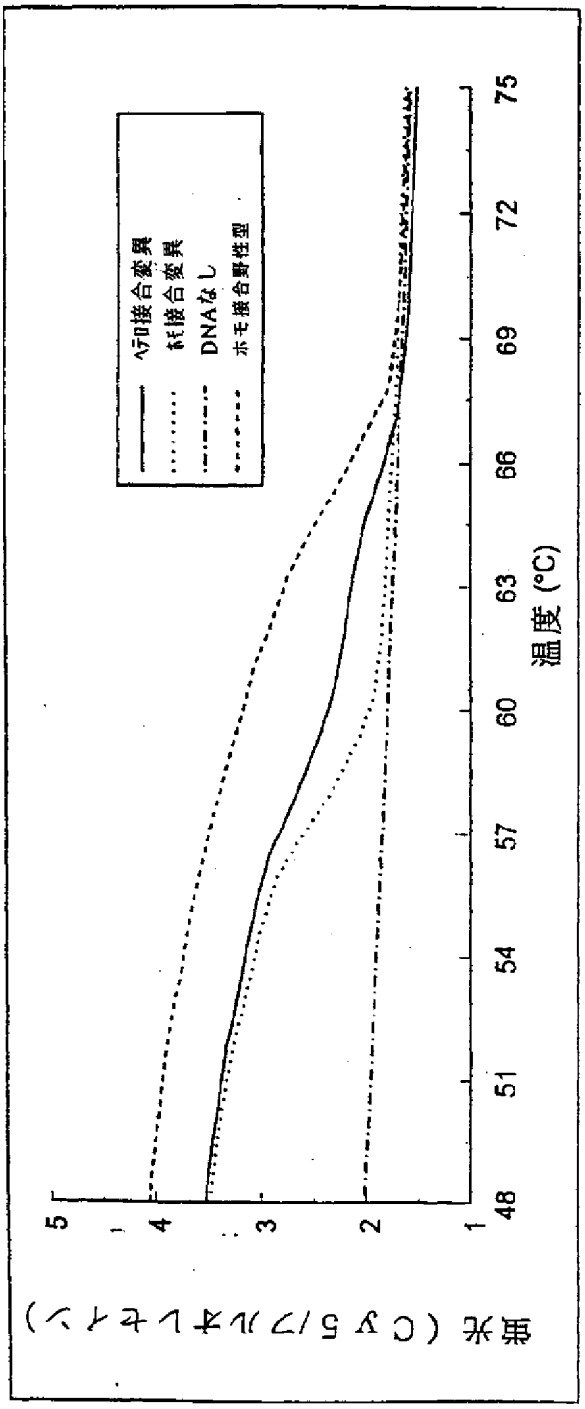
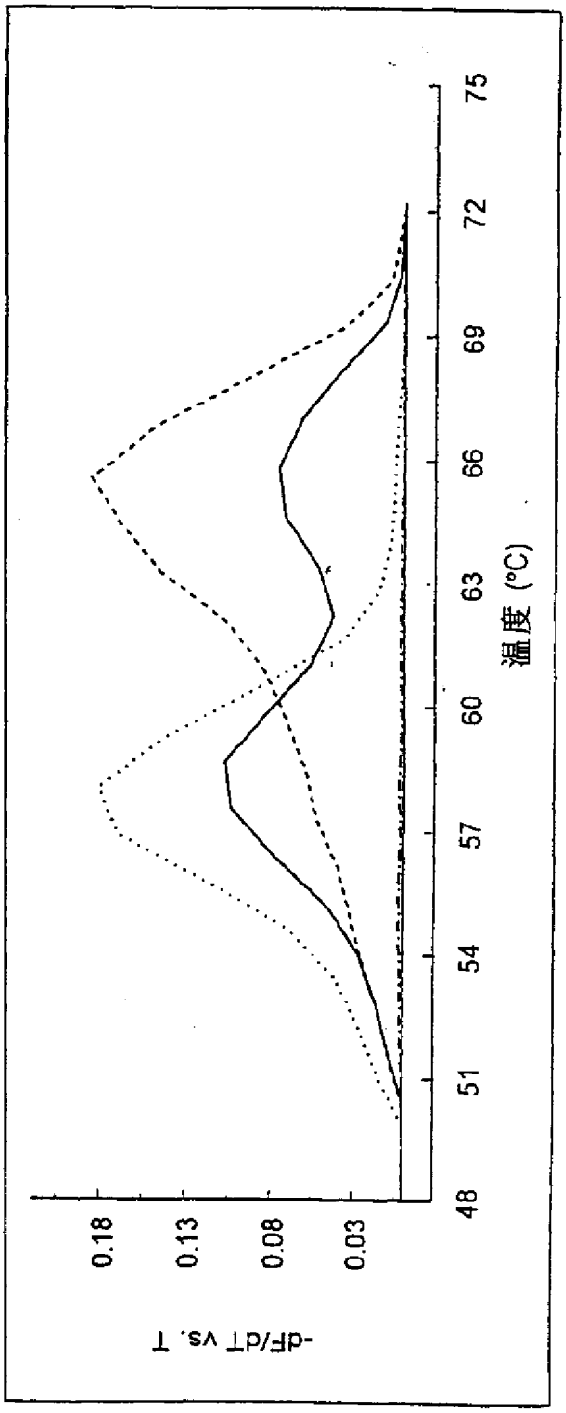
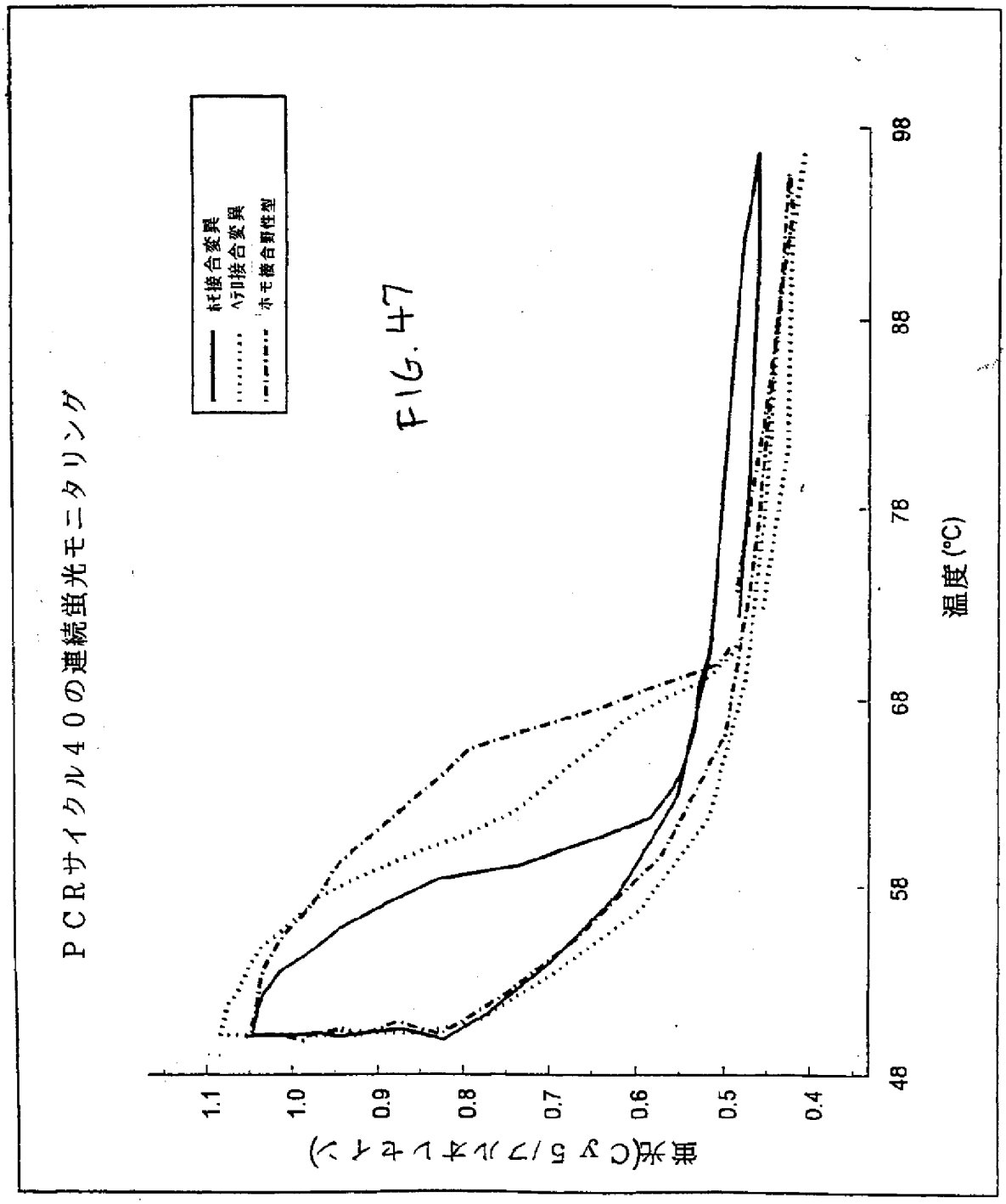


FIG. 46B

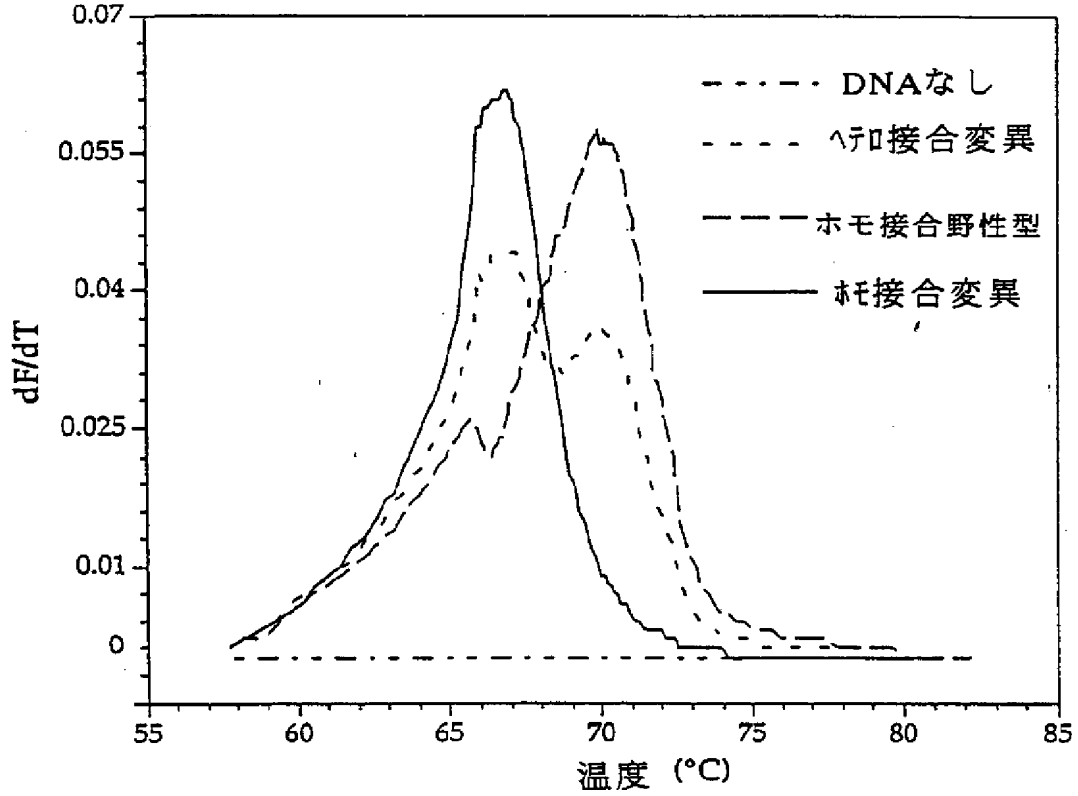


【図４７】


ＰＣＲサイクル４０の連続蛍光モニタリング
F16. 47
蛍光(ベースラインセット)
温度 (°C)
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
48
58
68
78
88
98

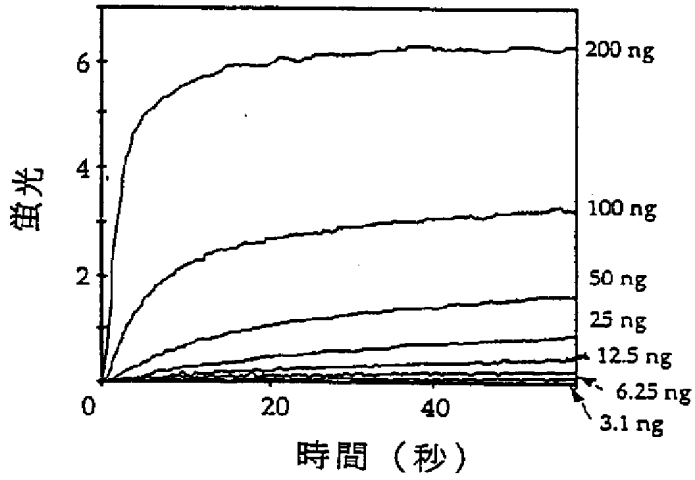
【図４８】

Figure 48



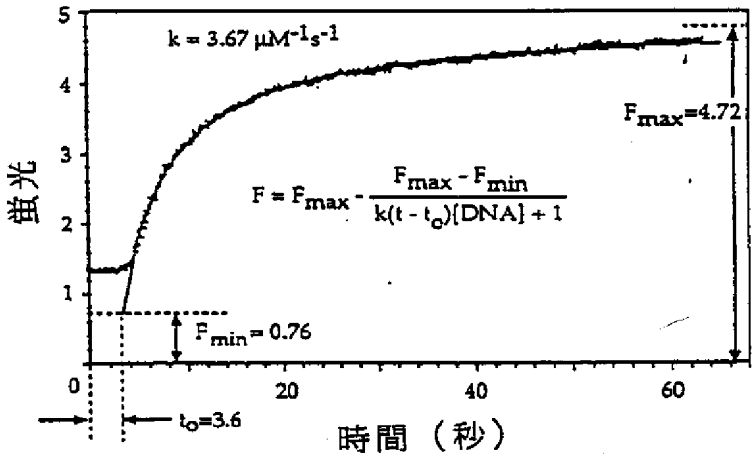
【図４９】

Figure 49



【図５０】

FIGURE 50



【図５１】

ライトサイクラー機能ブロック図

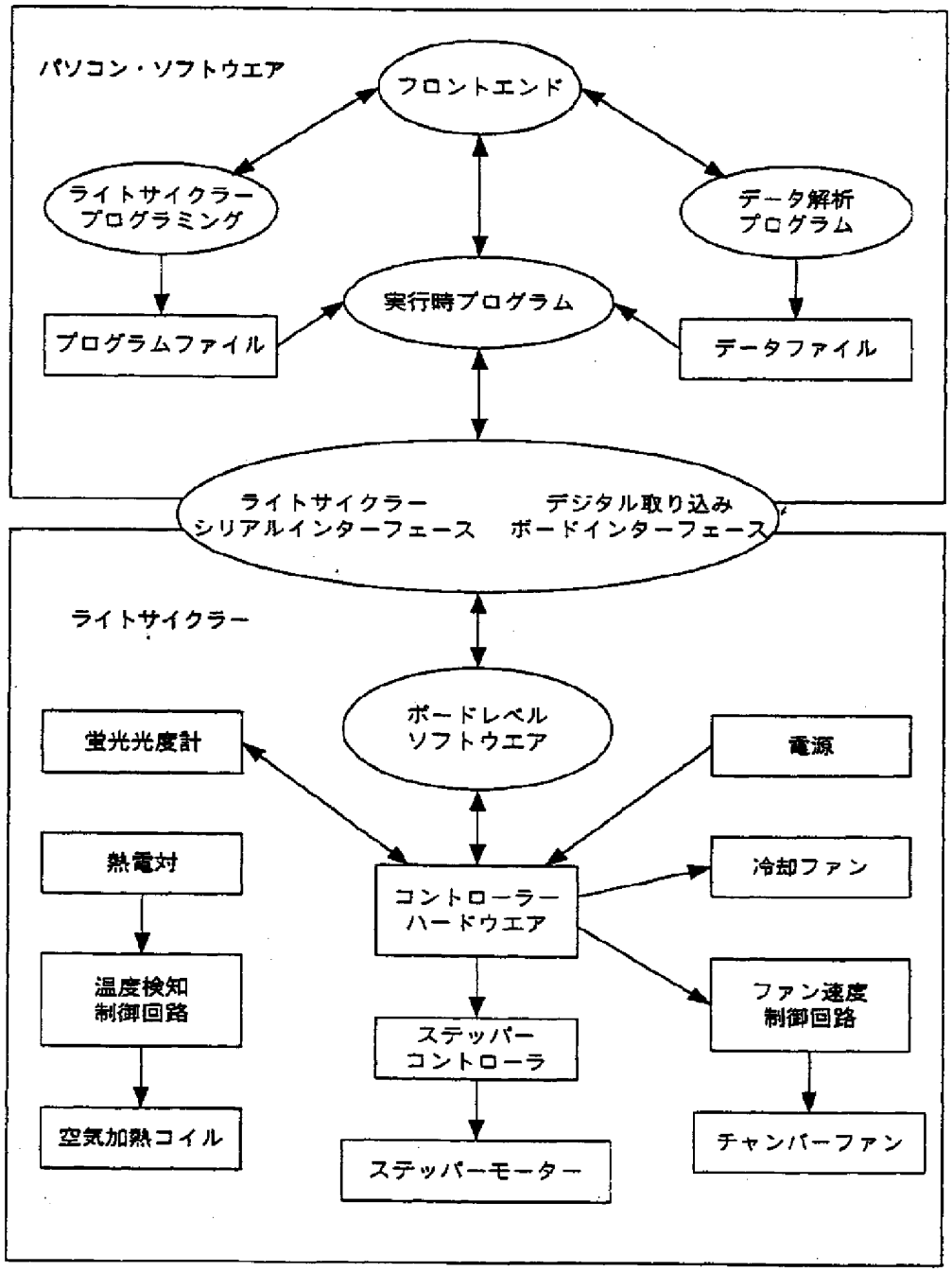
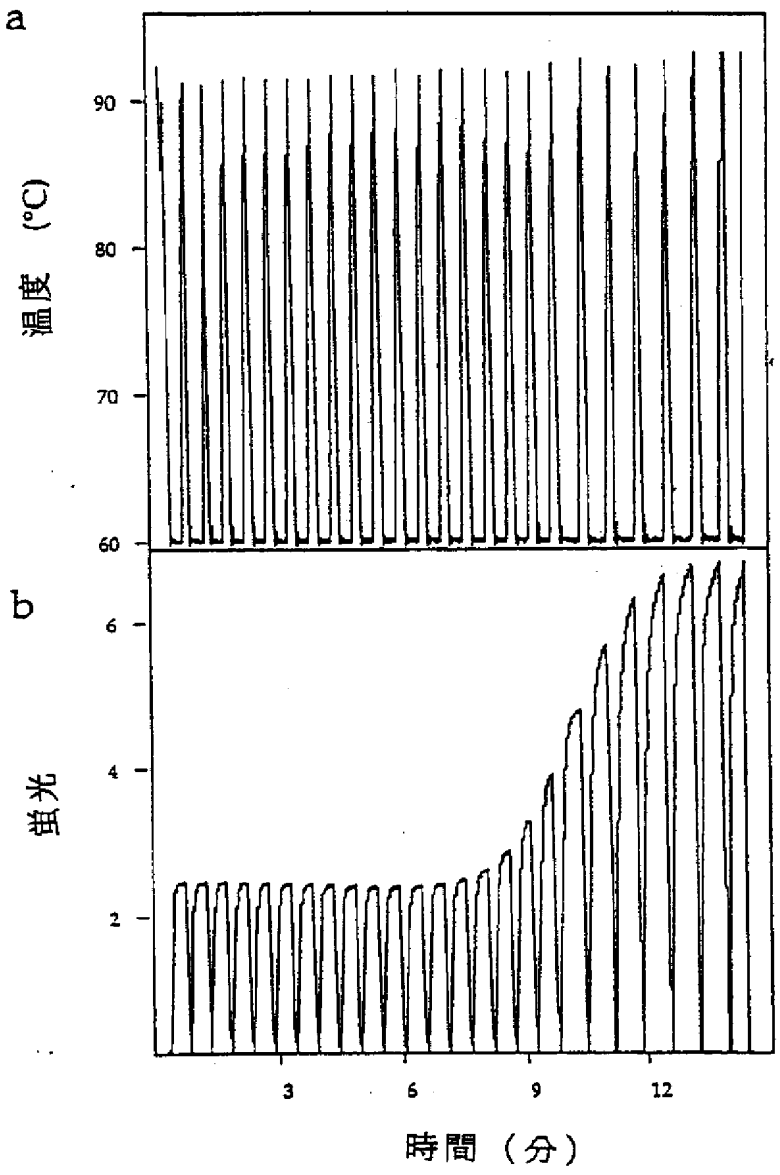


Figure 51.

【図５２】

Figure 52



【手続補正書】

【提出日】平成１１年１月１９日（１９９９．１．１９）

【補正内容】

（１）請求の範囲を別紙の通り差し替える。

（２）明細書第２９頁第２３行目に「図５３～１０５は本発明に従って使用可能なプログラミングを示す図である。」を挿入する。

（３）明細書第８７頁第４行目から第５行目の「以下のページ」とあるを、「図５３～１０５」と訂正する

（４）明細書第８８頁～第１４０頁を削除する。

（５）第５３図～第１０５図を別紙の通り追加する。

請求の範囲

１．生物学的サンプルの標的ＤＮＡ配列を分析するための方法であって、

標的配列の隣接部分にハイブリダイゼーションする２種類の核酸プローブ存在下に標的配列をポリメラーゼ連鎖反応により増幅するステップであって、前記プローブの一方は蛍光エネルギー転移対の受容体蛍光物質で標識され、前記プローブの他方は供与体蛍光物質で標識されて、前記標的配列と前記２種類のプローブのハイブリダイゼーション時に前記供与体蛍光物質及び受容体蛍光物質が互いに２５ヌクレオチド以内にあるようにし、前記ポリメラーゼ連鎖反応には前記標的核酸配列に対する熱安定性ポリメラーゼとプライマーを前記生物学的サンプルに添加するステップと少なくとも変性温度と延長温度との間で前記生物学的サンプルを熱サイクルするステップとを含むステップと、

前記供与体蛍光物質によって吸収される波長の光で前記生物学的サンプルを励起して前記蛍光エネルギー転移対からの放射を検出するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

２．生物学的サンプルの標的核酸配列を増幅する改良された方法であって、

（ａ）前記生物学的サンプルに核酸結合蛍光体の有効量を添加するステップと、

（ｂ）前記標的核酸配列についての熱安定性ポリメラーゼ及びプライマーを前

記生物学的サンプルに添加するステップと、少なくとも変性温度と延長温度の間で前記生物学的サンプルを熱サイクルするステップとを含み、所定の初期温度及び時間パラメータを用いるポリメラーゼ連鎖反応によって前記標的核酸配列を増幅し、

（ｉ）前記ポリメラーゼ連鎖反応中に前記蛍光体によって吸収される、選択した波長の光で前記生物学的サンプルを照明するステップと、

（ｉｉ）前記サンプルからの蛍光をモニタして前記ポリメラーゼ連鎖反応に最適な温度及び時間パラメータを決定するステップと、

（ｉｉｉ）前記検出された蛍光に基づき前記ポリメラーゼ連鎖反応中に前記初期温度及び時間パラメータを調節するステップと、

を含む前記標的核酸配列を増幅するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

３．前記蛍光体は二重鎖特異性核酸結合染料を含むことを特徴とする請求項２に記載の方法。

４．前記蛍光体は前記標的核酸配列にハイブリダイゼーションする蛍光標識オリゴヌクレオチド・プローブを含むことを特徴とする請求項２に記載の方法。

５．前記蛍光体はオリゴヌクレオチド・プローブの対を含み、前記プローブの一方は蛍光エネルギー転移対の受容体蛍光物質で標識され、前記プローブの他方は供与体蛍光物質で標識されることを特徴とする請求項２に記載の方法。

６．前記共鳴エネルギー転移対は供与体としてフルオレセイン又受容体としてＣｙ５又はＣｙ５．５を含むことを特徴とする請求項５に記載の方法。

７．フルオレセインで標識した第１のプローブとＣｙ５又はＣｙ５．５で標識した第２のプローブを含むことを特徴とする蛍光エネルギー転移対。

８．生物学的サンプルにおける標的核酸配列のポリメラーゼ連鎖反応増幅をリアルタイムでモニタする方法であって、

ＳＹＢＲ™グリーンＩ存在下にポリメラーゼ連鎖反応により前記標的配列を増幅し、前記ポリメラーゼ連鎖反応には前記標的核酸配列に対する熱安定性ポリメラーゼとプライマーを前記生物学的サンプルに添加するステップと少なくとも変

性温度と延長温度の間で前記生物学的サンプルを熱サイクルするステップとを含むステップと、

ＳＹＢＲ™グリーンＩにより吸収される波長の光で前記生物学的サンプルを励起して前記生物学的サンプルからの放射を検出するステップと、

前記ＳＹＢＲ™グリーンＩからの温度依存性蛍光をモニタするステップと、

を含むことを特徴とする方法。

９．前記モニタするステップは前記増幅した標的配列の溶解プロファイルを決定するステップを含むことを特徴とする請求項８に記載の方法。

１０．生物学的サンプルの標的ＤＮＡ配列を分析するための方法であって、

（ａ）２種類の核酸プライマーと核酸プローブの有効量を前記生物学的サンプルに添加し、前記プライマーの一方と前記プローブは各々受容体蛍光物質と供与体蛍光物質を含む蛍光エネルギー転移対の一方の構成要素で標識され、前記標識されたプローブが前記標識されたプライマーの１５ヌクレオチド以内の前記標的核酸配列の増幅コピーとハイブリダイゼーションするステップと、

（ｂ）ポリメラーゼ連鎖反応により前記標的核酸配列を増幅するステップと、

（ｃ）前記供与体蛍光物質によって吸収される選択した波長の光で前記生物学的サンプルを照明して前記サンプルの蛍光放射を検出するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

１１．前記ポリメラーゼ連鎖反応の総熱サイクル数は、前記サンプルからの蛍光放射をモニタし、反応完了を表わすプラトー・フェーズに前記蛍光放射が達した時点でサイクルを決定し、前記プラトー・フェーズに達した後で反応を停止することによって求められることを特徴とする請求項２に記載の方法。

１２．前記核酸結合蛍光体はＳＹＢＲ™グリーンＩ、臭化エチジウム、ピコグリーン、アクリジン・オレンジ、チアゾール・オレンジ、ＹＯ－ＰＲＯ－１、クロモマイシンＡ３から構成されるグループから選択される構成要素とすることを特徴とする請求項１１に記載の方法。

１３．前記ポリメラーゼ連鎖反応の温度サイクル・パラメータを制御するステップをさらに含み、前記生物学的サンプルを熱サイクルするステップはアニーリン

グ、延長、変性フェーズの反復サイクルを含み、前記核酸結合蛍光体は二重鎖特異性蛍光染料であり、前記サイクル・パラメータは前記アニーリング・フェーズの持続時間と、前記変性フェーズの持続時間と、サイクル数とを含み、

（ａ）選択した波長の光で前記反応を照明して前記蛍光染料からの蛍光を顕在化させ前記反復アニーリング、拡張、変性フェーズの間に蛍光を連続モニタするステップと、

（ｂ）少なくとも、

（ｉ）前記拡張フェーズの間に蛍光が増加を停止する持続時間、又は

（ｉｉ）前記変性フェーズの間に前記蛍光が基線レベルまで減少する持続時間、又は

（ｉｉｉ）前記拡張フェーズの間に前記蛍光が所定のレベルに達した回数を決定するステップと、

（ｃ）前記拡張フェーズの間に蛍光が増加を停止する時間の長さに基づいて前記拡張フェーズの長さを調節する、又は前記変性フェーズの間に蛍光が前記基線レベルまで減少した時間の長さに基づいて前記変性フェーズの長さを調節する、又は前記拡張フェーズの間に蛍光が前記所定レベルに達したサイクル数に基づいてサイクル数を調節するステップと、

を含むことを特徴とする請求項２に記載の方法。

１４．前記二重鎖特異性蛍光体はＳＹＢＲ™グリーンＩ、臭化エチジウム、ピコグリーン、アクリジン・オレンジ、チアゾール・オレンジ、ＹＯ－ＰＲＯ－１、クロモマイシンＡ３で構成されるグループから選択される構成要素とすることを特徴とする請求項１３に記載の方法。

１５．選択したポリメラーゼ連鎖反応混合物における増幅生成物の濃度を決定する方法であって、

（ａ）前記増幅生成物の既知の濃度のハイブリダイゼーションのレートをモニタすることにより選択した温度と反応条件での前記増幅生成物での２次速度定数を決定するステップと、

（ｂ）前記増幅生成物の未知の濃度でのアニーリング速度を決定するステップ

と、

（ｃ）前記アニーリング速度と前記２次速度定数から前記増幅生成物の濃度を計算するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

１６．前記アニーリング速度は多数サイクルの増幅後に決定されることを特徴とする請求項１５に記載の方法。

１７．増幅生成物の２次速度定数を決定して前記増幅生成物の濃度を求めるための方法であって、

既知の濃度の前記増幅生成物と有効量の二重鎖特異性蛍光染料とを含む第１のポリメラーゼ連鎖反応混合物の温度を、前記増幅生成物の変性温度以上に上昇させて変性増幅生成物を得るステップと、

前記既知の量の変性増幅生成物を含む前記第１のポリメラーゼ連鎖反応混合物の温度を、前記増幅生成物の変性温度以下の選択した温度まで急速に下げながら、時間の関数として前記第１のポリメラーゼ連鎖反応混合物の蛍光を連続モニタするステップと、

時間の関数として蛍光をプロットし、前記既知の濃度の増幅生成物についての極大蛍光、極小蛍光、極小蛍光での時間、２次速度定数を、

Ｆは蛍光、Ｆ maxは極大蛍光、Ｆ minは極小蛍光、ｋは２次速度定数、ｔ₀はＦ minでの時間、［ＤＮＡ］は前記増幅生成物の既知の濃度とする式：

$$F = F_{max} - \frac{F_{max} - F_{min}}{k\,(t - t_0)\,[DNA] + 1}$$

から求めるステップと、

を含むことを特徴とする方法。

１８．前記二重鎖特異性蛍光染料はＳＹＢＲ™グリーンＩ、臭化エチジウム、ピコグリーン、アクリジン・オレンジ、チアゾール・オレンジ、ＹＯ－ＰＲＯ－１、クロモマイシンＡ３から構成されるグループから選択される構成要素とすることを特徴とする請求項１７に記載の方法。

１９．　競合的定量ポリメラーゼ連鎖反応による選択した核酸テンプレートの濃

度を決定する方法であって、

（ａ）（ｉ）ポリメラーゼ連鎖反応において前記選択したテンプレートの選択したセグメントと競合的テンプレートのこれに対応する選択したセグメントを増幅してこれらの増幅生成物を得るように構成したオリゴヌクレオチド・プライマーの対の各々の有効量と、

（ｉｉ）蛍光共鳴エネルギー転移対の共鳴エネルギー転移供与体又は共鳴エネルギー転移受容体で標識された有効量のオリゴヌクレオチド・プローブであって、前記プローブが前記競合的テンプレートの増幅生成物から溶解する溶解温度から識別可能な溶解温度での前記選択したテンプレートの増幅生成物から溶解するように前記増幅生成物にハイブリダイゼーションするように構成されている前記プローブと、

（ｉｉｉ）前記プローブと転移オリゴヌクレオチドの間で一方が前記供与体により標識され他方が前記受容体により標識されているとして、前記供与体又は前記受容体で標識された有効量の基準オリゴヌクレオチドであって、前記基準オリゴヌクレオチドは前記プローブと前記基準オリゴヌクレオチドの両方が前記増幅生成物にハイブリダイゼーションする場合に前記供与体と前記受容体が共鳴エネルギー転移関係になるように前記増幅生成物にハイブリダイゼーションするよう構成されたオリゴヌクレオチドと、

を含む反応混合物において、

ポリメラーゼ連鎖反応により、未知の量の選択したテンプレートと既知の量の前記競合的テンプレートを増幅して前記増幅生成物を得るステップと、

（ｂ）前記反応混合物を選択した波長の光で照明して蛍光共鳴エネルギー転移対による蛍光を顕在化させ、反応混合物の温度が変化して前記選択したテンプレートの前記増幅生成物から溶解する前記プローブの第１の溶解曲線と前記競合的テンプレートから溶解する前記プローブの第２の溶解曲線とを得る場合に温度の関数として蛍光放射を決定するステップと、

（ｃ）前記第１と第２の溶解曲線から第１と第２の溶解溶解ピークに変換して当該溶解ピークから前記選択したテンプレートと前記競合的テンプレートの相対

量を決定するステップと、

（ｄ）前記既知の量の前記競合的テンプレートと、前記選択したテンプレート及び競合的テンプレートの相対量とに基づいて前記選択したテンプレートの濃度を計算するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

２０．　ポリメラーゼ連鎖反応において選択した核酸テンプレートの濃度を決定する方法であって、

（ａ）（ｉ）ポリメラーゼ連鎖反応において前記選択したテンプレートの選択した第１のセグメントを増幅して増幅した第１の生成物を得るように構成された第１の対のオリゴヌクレオチド・プライマーの各々の有効量と、

（ｉｉ）ポリメラーゼ連鎖反応において基準テンプレートの選択した第２のセグメントを増幅して増幅した第２の生成物を得るように構成された第２の対のオリゴヌクレオチド・プライマーの各々の有効量と、

（ｉｉｉ）核酸結合蛍光染料の有効量と、

を含む反応混合物において、

ポリメラーゼ連鎖反応により、未知の量の前記選択したテンプレートを増幅して前記増幅した第１の生成物を得る及び既知の量の前記基準テンプレートを増幅して前記増幅した第２の生成物を得るステップと、

（ｂ）選択した波長の光で前記反応混合物を照明して核酸結合蛍光染料による蛍光を顕在化させ、温度の関数として放射された蛍光を連続的にモニタして第１の生成物と第２の生成物が異なる温度で溶解するような前記増幅生成物の溶解曲線を得るステップと、

（ｃ）前記溶解曲線を溶解溶解ピークに変換して当該溶解ピークから前記選択したテンプレートと前記基準テンプレートの相対量を決定するステップと、

（ｄ）前記既知の量の前記基準テンプレートと選択したテンプレート及び基準テンプレートの相対量とに基づいて前記選択したテンプレートの濃度を計算するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

２１．前記核酸結合蛍光染料はＳＹＢＲ™グリーンＩ、臭化エチジウム、ピコグリーン、アクリジン・オレンジ、チアゾール・オレンジ、ＹＯ－ＰＲＯ－１、クロモマイシンＡ３から構成されるグループから選択されることを特徴とする請求項２０に記載の方法。

２２．陽性対照テンプレートも含むポリメラーゼ連鎖反応において選択したテンプレートの増幅をモニタする方法であって、

（ａ）（ｉ）ポリメラーゼ連鎖反応において前記選択したテンプレートの選択した第１のセグメントを増幅して増幅された第１の生成物を得るように構成された第１の対のオリゴヌクレオチド・プライマーの各々の有効量と、

（ｉｉ）ポリメラーゼ連鎖反応において、陽性対照テンプレートの選択された第２のセグメントを増幅して増幅された第２の生成物を得るように構成された第２の対のオリゴヌクレオチド・プライマーの各々の有効量と、

（ｉｉｉ）有効量の核酸結合蛍光染料と、

を含む反応混合物において、

前記選択したテンプレートと前記陽性対照テンプレートをポリメラーゼ連鎖反応によって増幅するための条件に前記選択したテンプレートと前記陽性対照テンプレートをさらすステップと、

（ｂ）前記反応混合物を選択した波長の光で照明して核酸結合蛍光染料による蛍光を顕在化し、前記ポリメラーゼ連鎖反応の増幅サイクル中に温度の関数として放射される蛍光を連続的にモニタして前記選択したテンプレートが増幅される場合前記増幅された第１の生成物の第１の溶解ピークを、また前記陽性対照テンプレートが増幅される場合前記増幅された第２の生成物の第２の溶解ピークを取得するステップとを含み、

前記第２の溶解曲線の取得はポリメラーゼ連鎖反応が作用したことを表わし、前記第１の溶解曲線の取得は前記選択した第１のセグメントが増幅可能であることを表わし、前記第１の溶解曲線が欠如していることは前記選択した第１のセグメントが増幅不可能であることを表わす

ことを特徴とする方法。

２３．前記核酸結合蛍光染料はＳＹＢＲ™グリーンＩ、臭化エチジウム、ピコグリーン、アクリジン・オレンジ、チアゾール・オレンジ、ＹＯ－ＰＲＯ－１、クロモマイシンＡ３から構成されるグループから選択されることを特徴とする請求項２２に記載の方法。

２４．　個人の第Ｖ因子ライデン変異を検出する方法であって、第Ｖ因子ライデン変異は野生型と比較して第Ｖ因子ライデン変異配座での単一塩基変化で構成され、

（ａ）前記個人からサンプル・ゲノムＤＮＡを採得するステップと、

（ｂ）対照として野生型ゲノムＤＮＡを提供するステップと、

（ｃ）前記サンプル・ゲノムＤＮＡと前記野生型ゲノムＤＮＡの選択したセグメントをポリメラーゼ連鎖反応によって増幅するように構成されたオリゴヌクレオチド・プライマーの対を提供し、前記選択したセグメントは第Ｖ因子ライデン変異配座を含み、第Ｖ因子ライデン変異配座のコピーを含む増幅生成物を得るステップと、

（ｄ）蛍光共鳴エネルギー転移対の共鳴エネルギー転移供与体又は共鳴エネルギー転移受容体で標識されたオリゴヌクレオチド・プローブを提供し、前記プローブは前記増幅された生成物にハイブリダイゼーションするように構成されて前記プローブが前記変異配座にまたがり前記サンプル・ゲノムＤＮＡに前記野生型ゲノムＤＮＡの溶解プロファイルから区別できる第Ｖ因子ライデン変異が存在する場合溶解プロファイルを示すステップと、

（ｅ）共鳴エネルギー転移供与体又は共鳴エネルギー転移受容体で標識された転移オリゴヌクレオチドを提供し、前記プローブと転移オリゴヌクレオチドの間で一方が共鳴エネルギー転移供与体で標識され他方が共鳴エネルギー転移受容体で標識されているとして、前記転移オリゴヌクレオチドは前記増幅生成物にハイブリダイゼーションするように構成して前記プローブと前記転移オリゴヌクレオチドの両方が前記増幅生成物にハイブリダイゼーションする場合に共鳴エネルギー転移供与体と共鳴エネルギー転移受容体が共鳴エネルギー転移関係にあるようにするステップと、

（ｆ）有効量のオリゴヌクレオチド・プローブと転移オリゴヌクレオチドの存在下でサンプル・ゲノムＤＮＡと野生型ゲノムＤＮＡの前記選択したセグメントをポリメラーゼ連鎖反応により増幅して、増幅された選択セグメントを得るようにし、少なくともその一部分は共鳴エネルギー転移関係にある蛍光共鳴エネルギー転移対によりこれらにハイブリダイゼーションされた前記プローブと前記転移オリゴヌクレオチドの両方を有するようにするステップと、

（ｇ）前記ポリメラーゼ連鎖反応の増幅サイクルの間の温度の関数として蛍光を測定してサンプル・ゲノムＤＮＡの前記増幅セグメントから溶解する前記プローブの溶解プロファイルと前記野生型ゲノムＤＮＡの増幅セグメントから溶解する前記プローブの溶解プロファイルとを取得するステップと、

（ｈ）前記サンプル・ゲノムＤＮＡについての前記溶解プロファイルを前記野生型ゲノムＤＮＡについての前記溶解プロファイルと比較し、これらの差が前記サンプル・ゲノムＤＮＡにおける第Ｖ因子ライデン変異の存在を表わすステップと、

を含むことを特徴とする方法。

２５．　核酸ハイブリダイゼーションを分析するための方法であって、

（ａ）分析すべき核酸サンプルと核酸結合蛍光体とを含む混合物を提供するステップと、

（ｂ）温度を≧毎秒０．１℃の速度で変化させながら蛍光をモニタするステップと、

を含むことを特徴とする方法。

２６．前記核酸結合蛍光染料がＳＹＢＲ™グリーンＩであることを特徴とする請求項２５に記載の方法。

２７．前記核酸結合蛍光体はオリゴヌクレオチド・プローブの対を含み、前記プローブの一方が蛍光共鳴エネルギー転移対の供与体で標識され前記プローブの他方が受容体で標識されることを特徴とする請求項２５に記載の方法。

２８．未知の量の核酸を含むサンプルの初期コピー数を定量する方法であって、

（ａ）ポリメラーゼ連鎖反応により既知の濃度の少なくとも一つの標準を、前

記標準と核酸結合蛍光体とを含む混合物中で増幅し、ここで前記核酸結合蛍光体は一対のオリゴヌクレオチド・プローブを含み、その一方は蛍光共鳴エネルギー転移対の供与体で標識され、他方は受容体で標識されるステップと、

（ｂ）サイクル数の関数として蛍光を測定して一組のデータ点を得るステップと、

（ｃ）初期核酸濃度とサイクル数の関数として蛍光を記述する所定の式に前記データ点を当てはめるステップと、

（ｄ）前記サンプルと前記核酸結合蛍光体とを含む混合物中で未知の量の核酸を含む前記サンプルを増幅してその蛍光をモニタするステップと、

（ｅ）ステップ（ｃ）で求めた式から初期核酸濃度を決定するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

２９．　生物学的サンプルの標的ＤＮＡ配列を分析するための方法であって、

核酸結合蛍光体の存在下にポリメラーゼ連鎖反応によって前記標的配列を増幅し、前記ポリメラーゼ連鎖反応には前記標的とされる核酸配列に対する熱安定性ポリメラーゼ及びプライマーを前記生物学的サンプルに添加して少なくとも変性温度と延長温度の間で前記生物学的サンプルを熱サイクルするステップを含むステップと、

前記核酸結合蛍光体により吸収される波長の光によって前記サンプルを励起するステップと、

前記サンプルの温度が変化する際に前記核酸結合蛍光体からの温度依存性蛍光をモニタするステップと、

を含むことを特徴とする方法。

３０．前記核酸結合蛍光体は二重鎖核酸結合蛍光染料を含むことを特徴とする請求項２９に記載の方法。

３１．前記二重鎖核酸結合蛍光染料がＳＹＢＲ™グリーンＩであることを特徴とする請求項３０に記載の方法。

３２．前記温度依存性蛍光を用いて前記増幅生成物を同定することを特徴とする請求項３１に記載の方法。

３３．前記増幅生成物が溶解曲線の分析によって同定されることを特徴とする請求項３２に記載の方法。

３４．２種類又はそれ以上の増幅生成物の相対量を溶解曲線の分析によって求めることを特徴とする請求項３３に記載の方法。

３５．溶解曲線より下の領域が多重ガウス曲線の和の非線形最小自乗法回帰で見付けられることを特徴とする請求項３３に記載の方法。

【図５３】

図５３

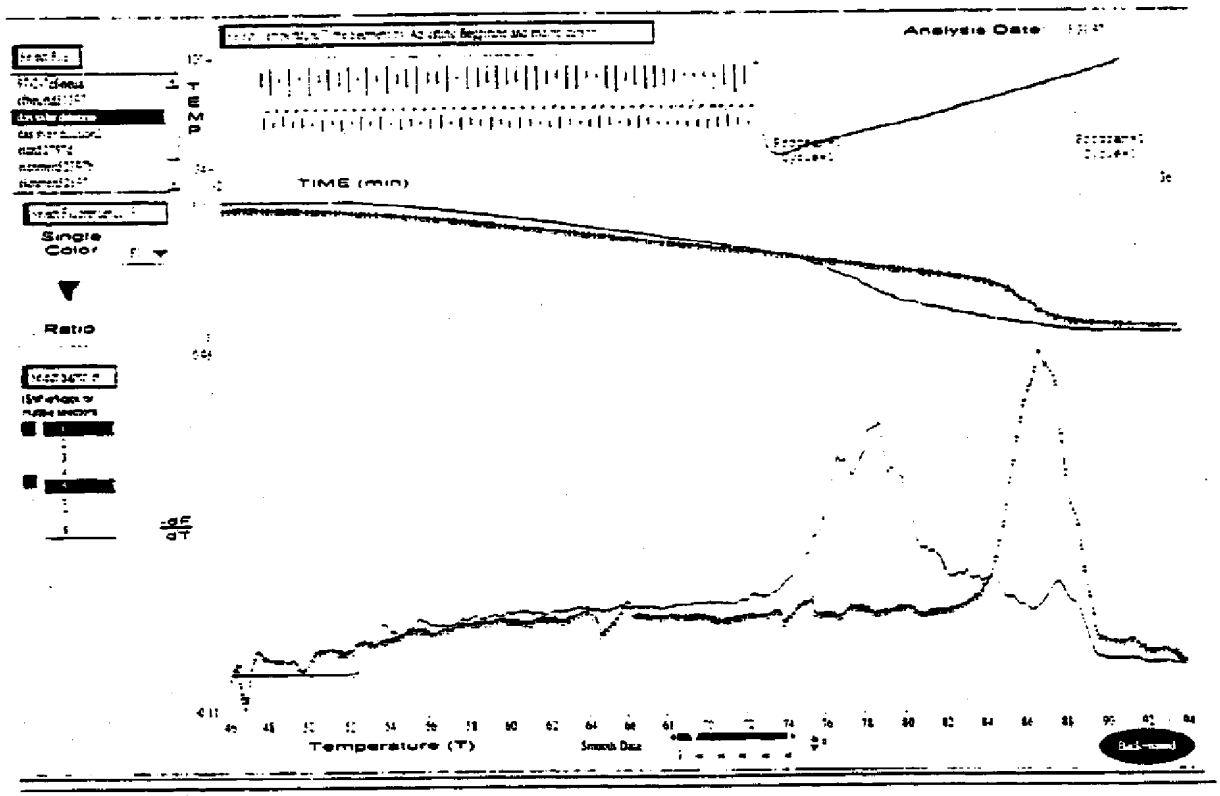
Page 1

CTWMelt11.vi
Last modified on 6/2/97 at 7:28 PM
Printed on 6/2/97 at 7:39 PM

Connector Pane

CTWMelt11.vi

Front Panel



Controls and Indicators

- I16 Smooth
- I32 Select File
- I32 S or C
- TF stop
- U32 Color Preferences

【図５４】

図５４



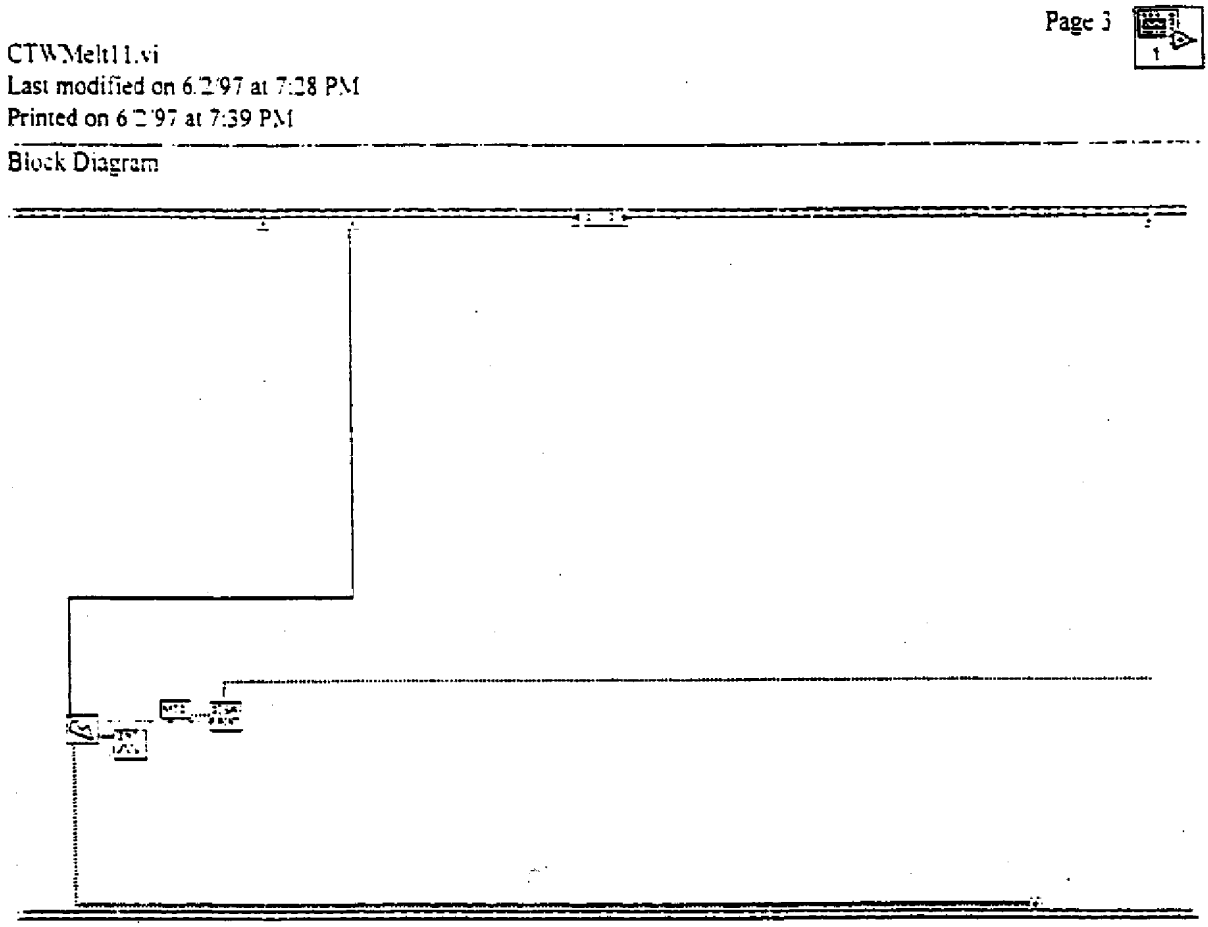
CTWMelt11.vi
Last modified on 6/2/97 at 7:28 PM
Printed on 6/2/97 at 7:39 PM

U32
U8
TF F
U8
I32 Slope Method
TF Samples
Cycles
U8 Sample #
-dF/dT
vs T
F vs T
U32 Color Display
U32
Select Temperature/Time Segment by Adjusting Beginning and Ending Cursors

abc
abc Analysis Date:
abc Select File
abc Temp/Time
abc Fluor
abc Samples/Cycles
abc Smoothing
U16 Points
U16 Points
U16 Flo File
U16 Temp File
U8 Cycles
abc
abc

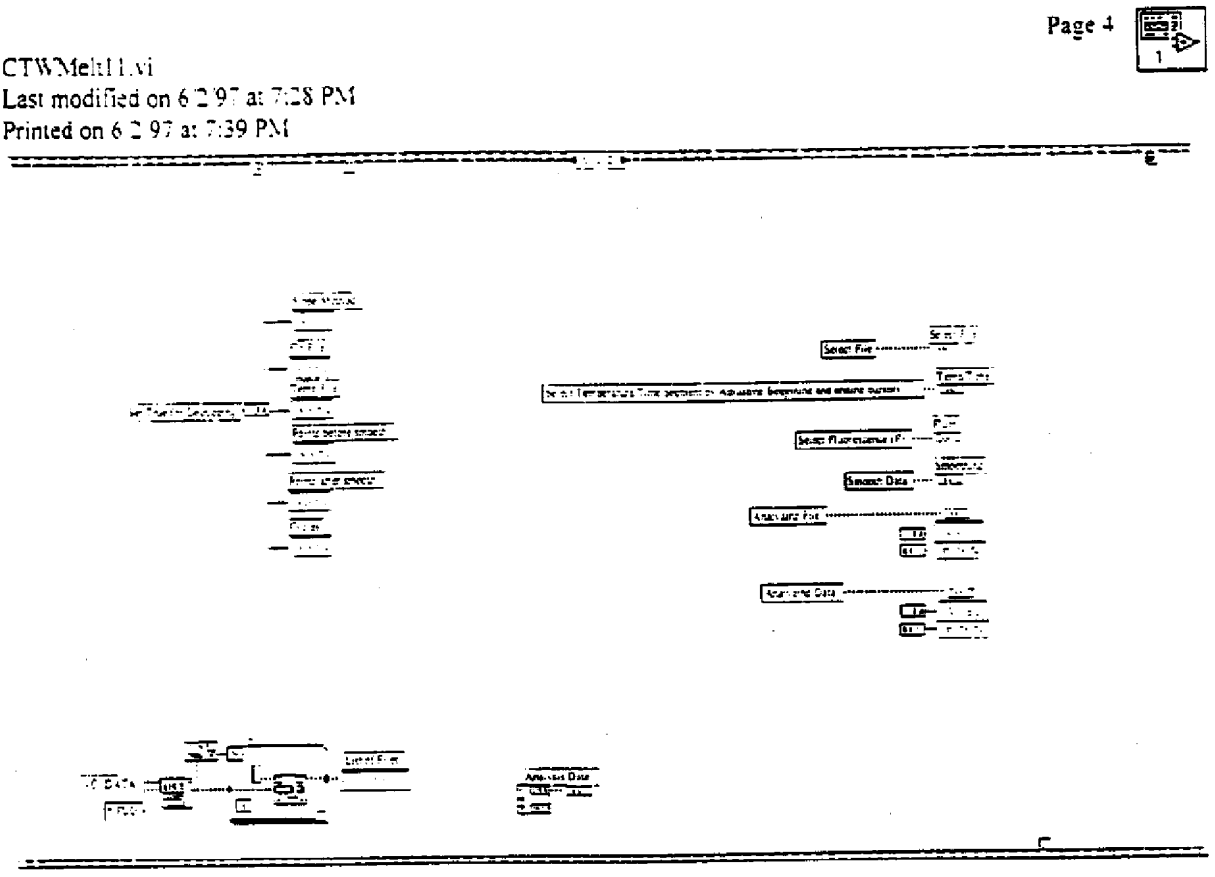
【図５５】

図５５


Page 3
CTWMelt11.vi
Last modified on 6/2/97 at 7:28 PM
Printed on 6/2/97 at 7:39 PM
Block Diagram

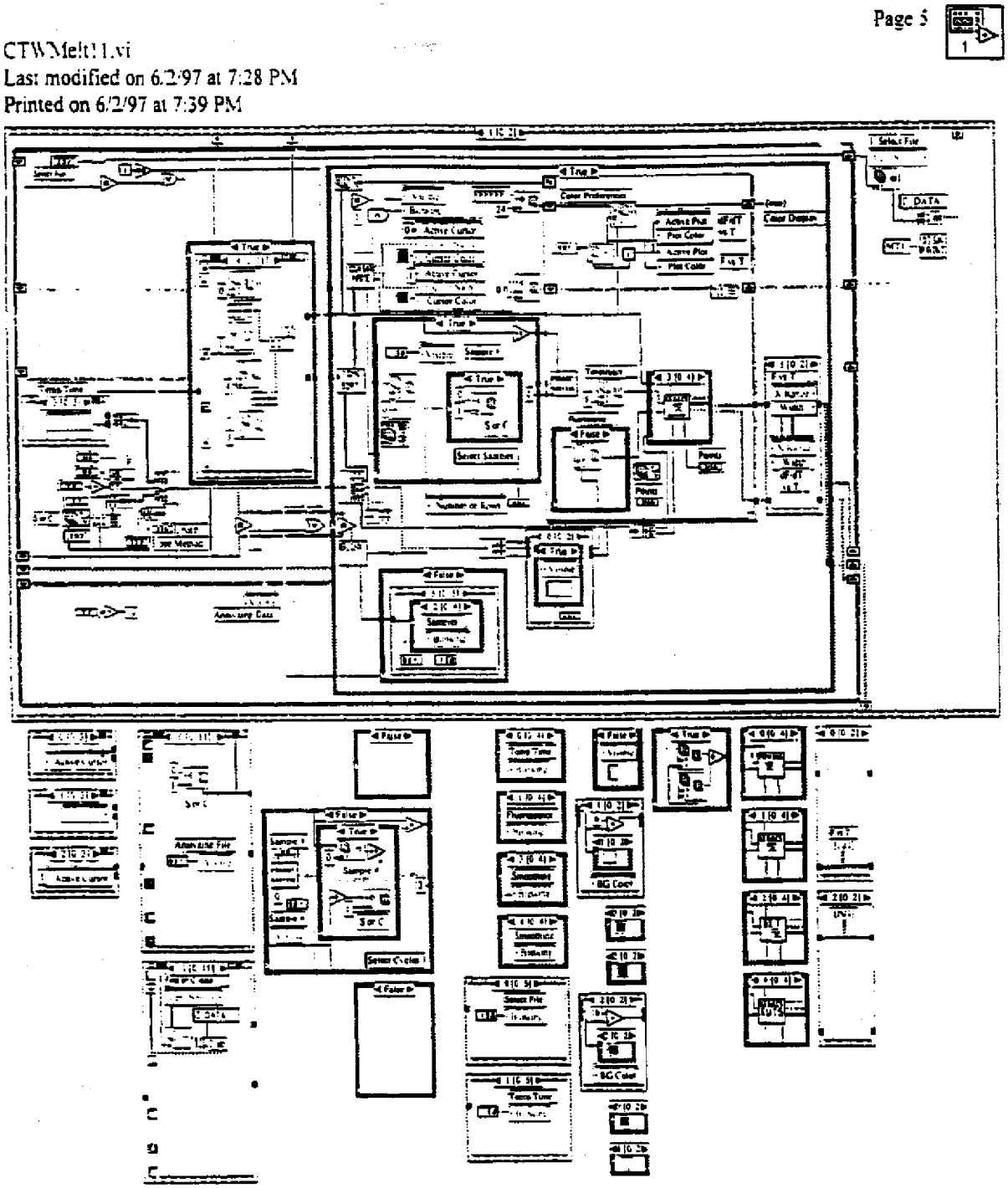
【図５６】

図５６


Page 1
CTWMelt11.vi
Last modified on 6/2/97 at 7:28 PM
Printed on 6/2/97 at 7:39 PM

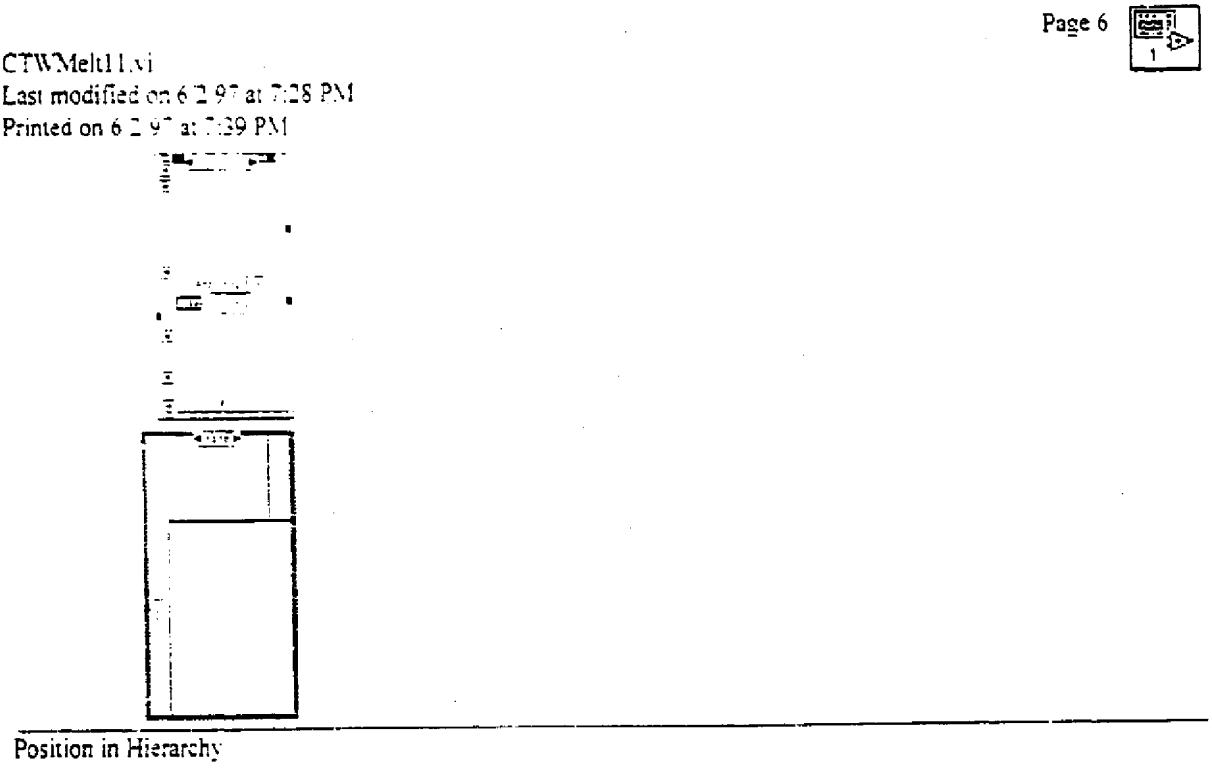
【図５７】

図５７


Page 5
CTWMelt11.vi
Last modified on 6/2/97 at 7:28 PM
Printed on 6/2/97 at 7:39 PM

【図５８】

図５８

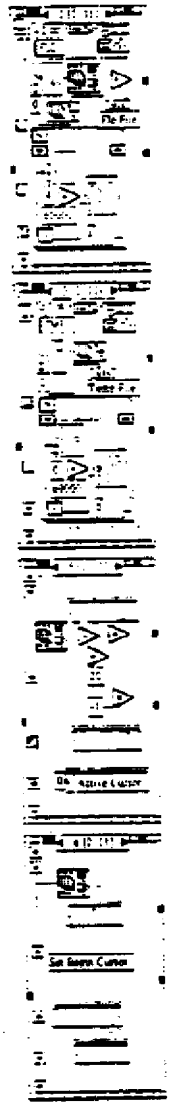

Page 6
CTWMelt11.vi
Last modified on 6/2/97 at 7:28 PM
Printed on 6/2/97 at 7:39 PM
Position in Hierarchy

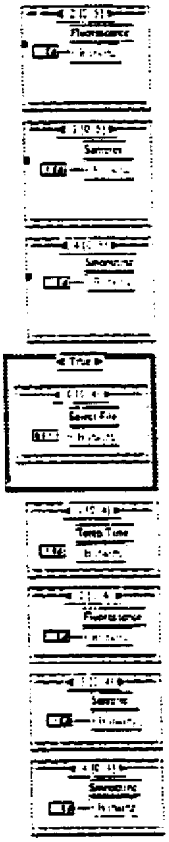
【図５９】

図５９

Page 7

CTWMelt11.vi
Last modified on 6/2/97 at 7:28 PM
Printed on 6/2/97 at 7:39 PM

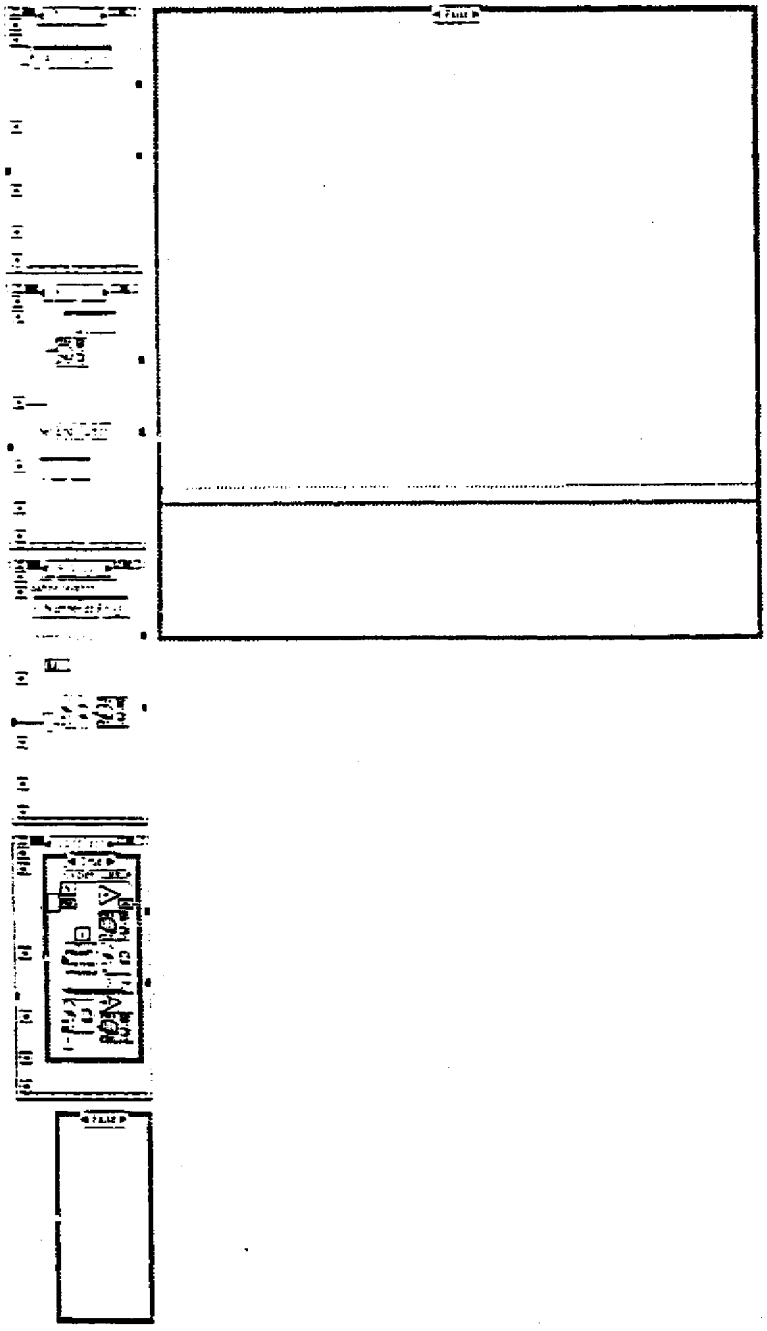




【図６０】

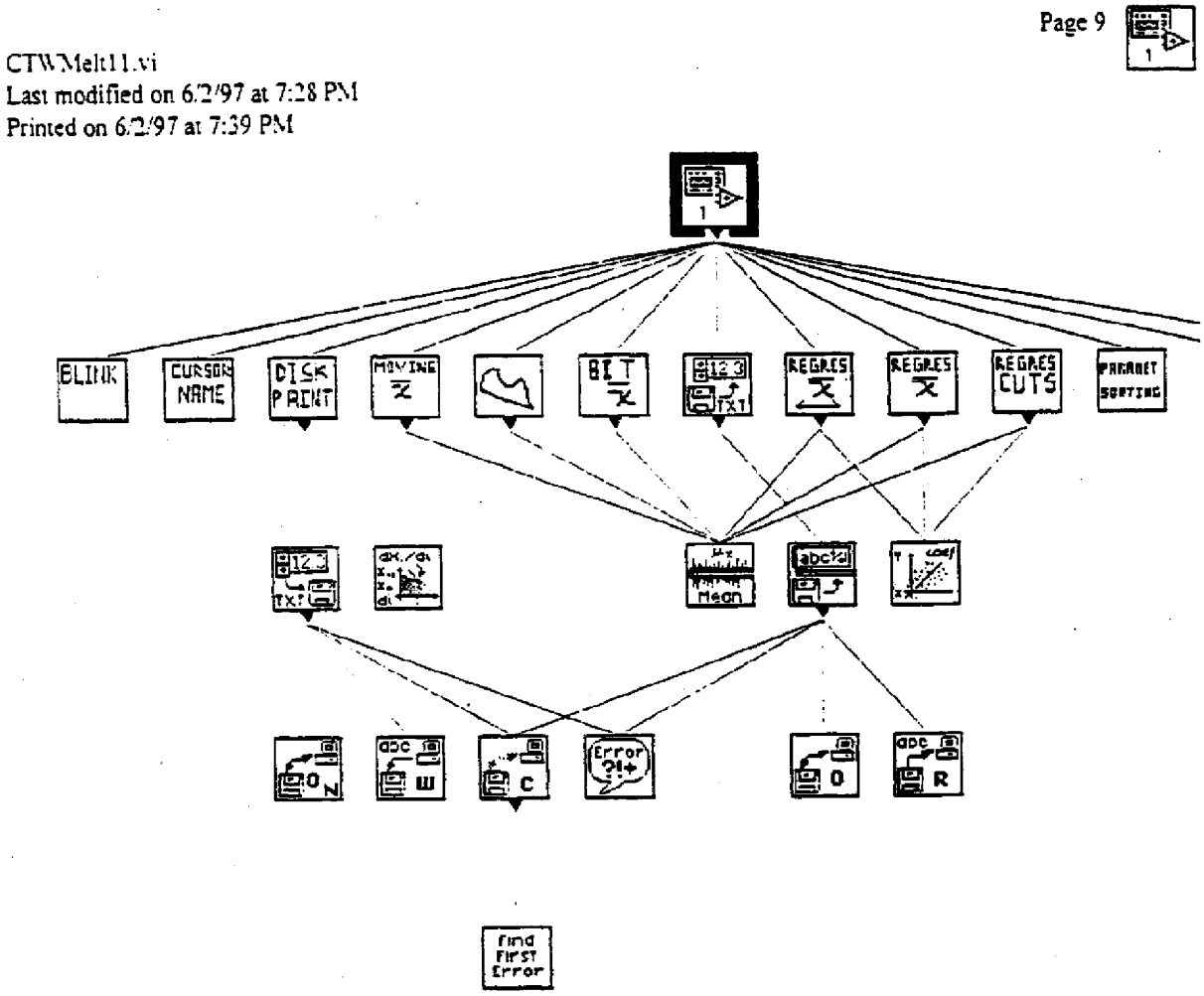
図６０

CTWMelt1.vi
Last modified on 6 2 97 at 7:28 PM
Printed on 6 2 97 at 7:39 PM



【図６１】

図６１

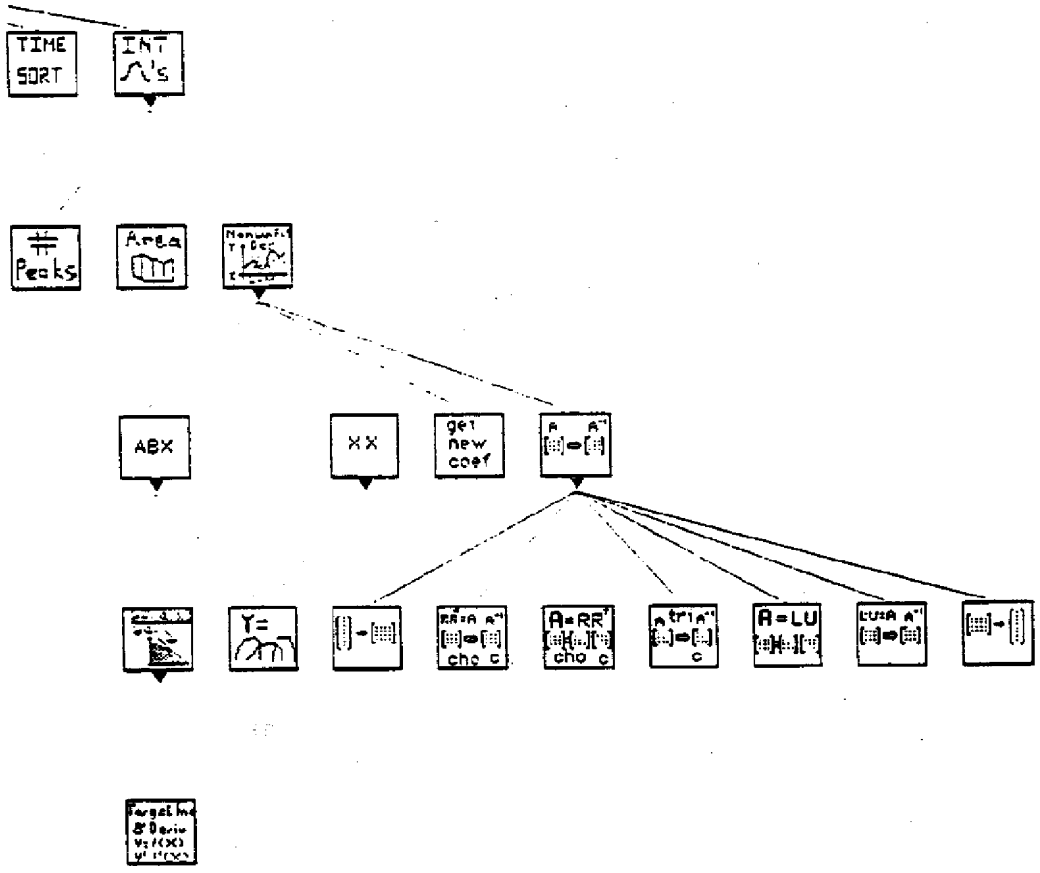

Page 9
CTWMelt11.vi
Last modified on 6/2/97 at 7:28 PM
Printed on 6/2/97 at 7:39 PM
BLINK
CURSOR NAME
DISK PRINT
MOVING
BIT
REGRES
REGRES
REGRES CUTS
PARAMET SORTING
Mean
Error ?!+
find first error
List of SubVIs
BLINK
Blinck updates.vi
C:\data 1\Blinck updates.vi
PARAMET SORTING
Sample Number Sorting.vi
C:\data 1\Sample Number Sorting.vi

【図６２】

図６２

Page 10

CTWMelt11.vi
Last modified on 6/2/97 at 7:28 PM
Printed on 6/2/97 at 7:39 PM



【図６３】

図６３

CTWMelt11.vi
Last modified on 6/2/97 at 7:28 PM
Printed on 6/2/97 at 7:39 PM

Time sort.vi
C:\data 1\Time sort.vi

Cursor Name.vi
C:\data 1\Cursor Name.vi

Moving Avg.vi
C:\data 1\Moving Avg.vi

Bit moving av g.vi
C:\data 1\Bit moving av g.vi

Read From Spreadsheet File.vi
C:\LABVIEW\vi.lib\UTILITY\file.llb\Read From Spreadsheet File.vi

Regression Avg.vi
C:\data 1\Regression Avg.vi

Regression Cuts.vi
C:\data 1\Regression Cuts.vi

Background.vi
C:\data 1\Background.vi

Disk Print.vi
C:\data 1\Disk Print.vi

Sum of gaussians.vi
C:\data 1\Sum of gaussians.vi

Regression Avg with Ends.vi
C:\data 1\Regression Avg with Ends.vi

History

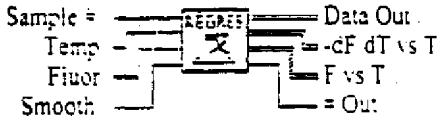
"CTWMelt11.vi History"
Current Revision: 181

【図６４】

図６４

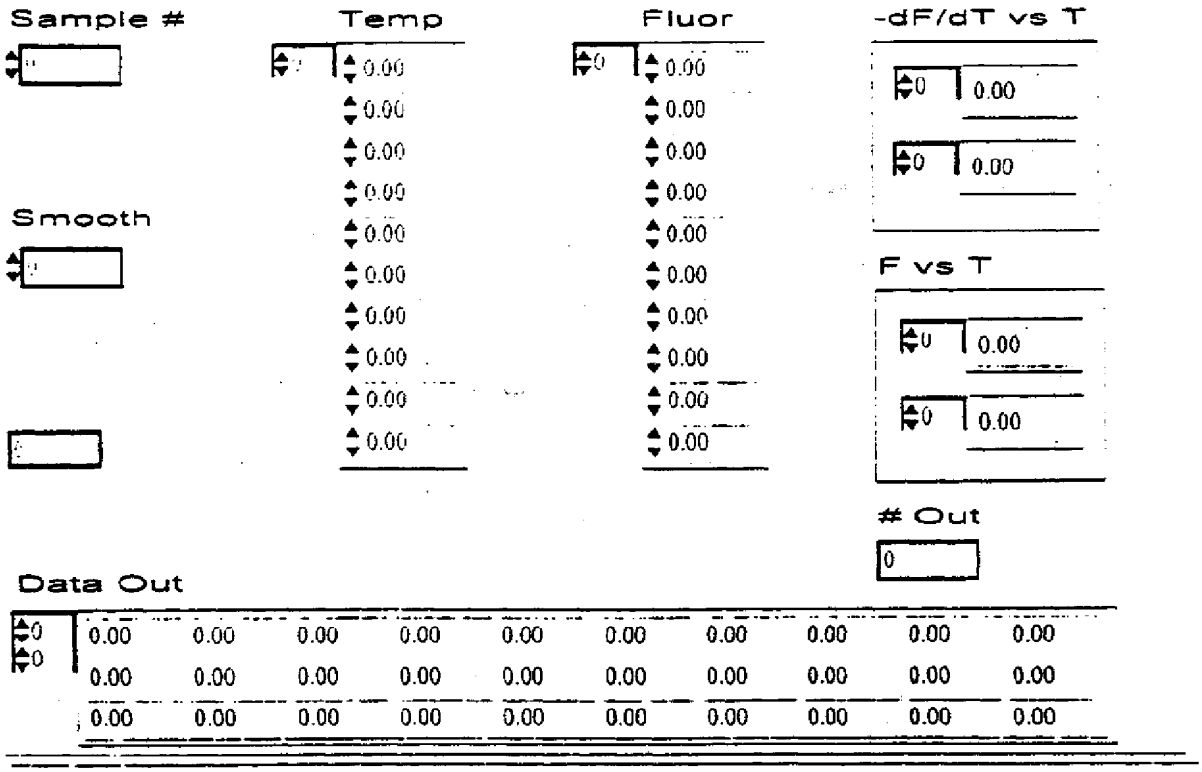
Regression Avg with Ends.vi
Last modified on 3/25/97 at 1:42 PM
Printed on 6/3/97 at 10:54 AM

Connector Pane



Regression Avg with Ends.vi

Front Panel

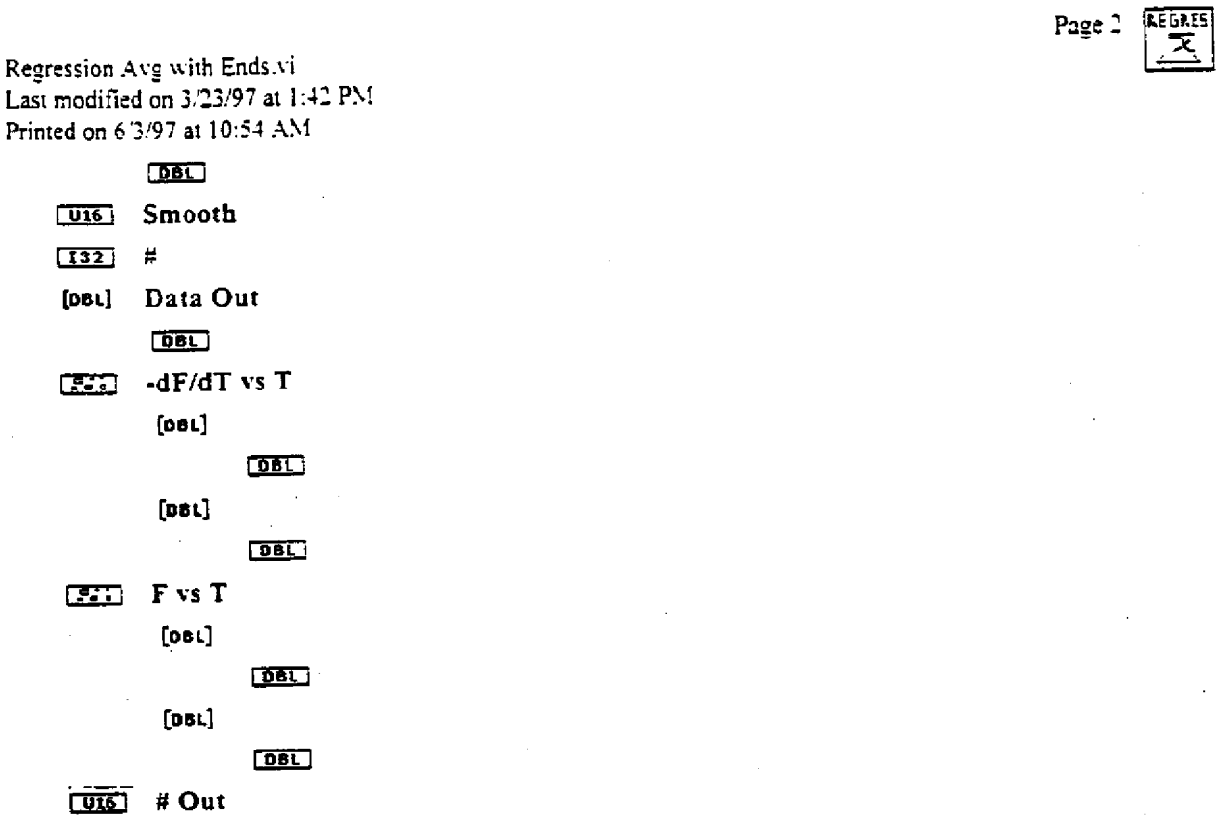


Controls and Indicators

U8 Sample #
[DBL] Temp
DBL
[DBL] Fluor

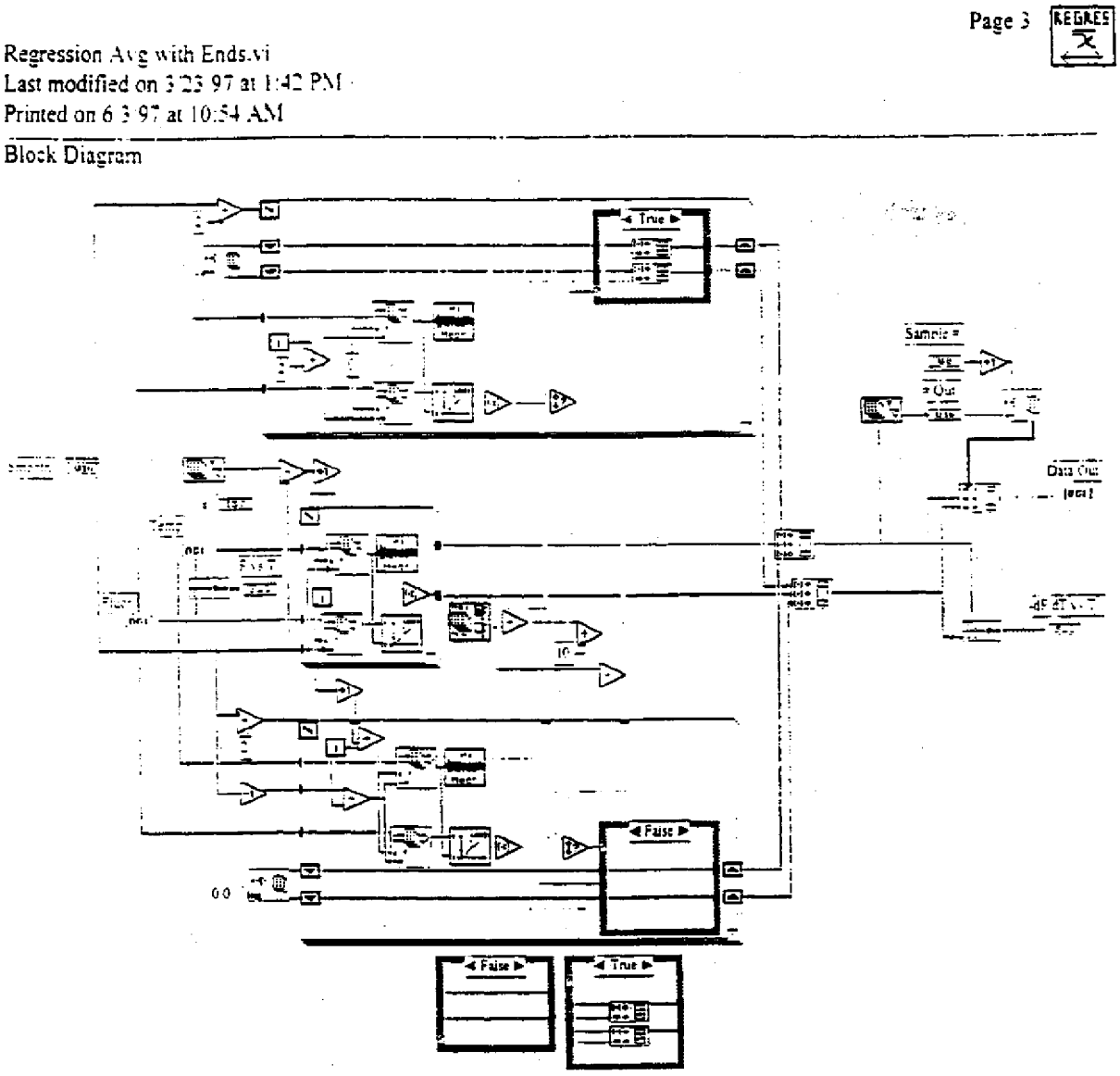
【図６５】

図６５


Page 2
REGRES
Regression Avg with Ends.vi
Last modified on 3/23/97 at 1:42 PM
Printed on 6/3/97 at 10:54 AM
DBL
U16
Smooth
I32
#
DBL
Data Out
DBL
-dF/dT vs T
DBL
DBL
DBL
DBL
F vs T
DBL
DBL
DBL
DBL
U16
Out

【図６６】

図６６


Page 3
REGRES
Regression Avg with Ends.vi
Last modified on 3/23/97 at 1:42 PM
Printed on 6/3/97 at 10:54 AM
Block Diagram
True
Sample
Data Out
False
True
Position in Hierarchy

【図６７】

図６７

Regression Avg with Ends.vi
Last modified on 3/23/97 at 1:42 PM
Printed on 6/3/97 at 10:54 AM







List of SubVIs



Mean.vi
C:\LABVIEW\vi.lib\ANALYSIS\5stat.llb\Mean.vi



Linear Fit Coefficients.vi
C:\LABVIEW\vi.lib\ANALYSIS\6fits.llb\Linear Fit Coefficients.vi

History

"Regression Avg with Ends.vi History"
Current Revision: 13

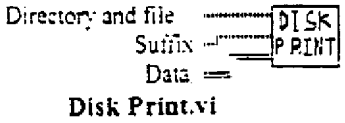
【図６８】

図６８

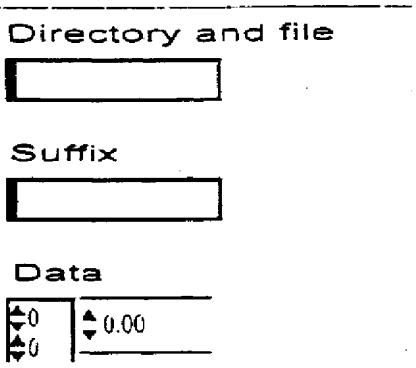
Page 1

Disk Print.vi
Last modified on 5/31/97 at 2:59 AM
Printed on 6/3/97 at 11:02 AM

Connector Pane



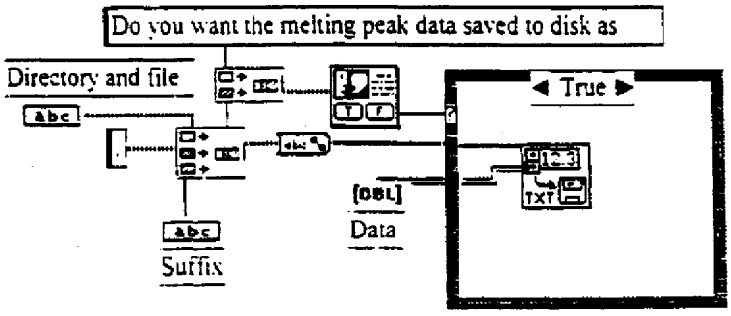
Front Panel



Controls and Indicators

abc Directory and file
abc Suffix
[DBL] Data
DBL

Block Diagram

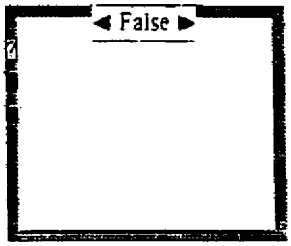


【図６９】

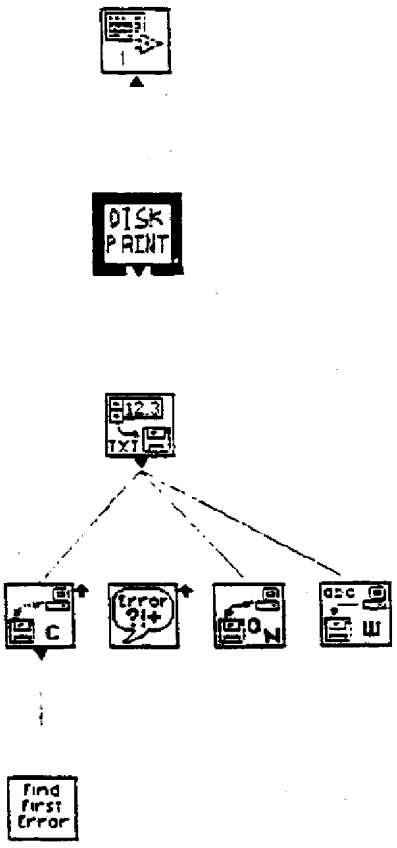
図６９

Page 2

Disk Print.vi
Last modified on 5/31/97 at 2:59 PM
Printed on 6/3/97 at 11:02 AM



Position in Hierarchy



List of SubVIs

Write To Spreadsheet File.vi
C:\LABVIEW\vi.lib\UTILITY\file.llb\Write To Spreadsheet File.vi

【図７０】

図７０

DISK PRINT

Disk Print.vi
Last modified on 5 31 97 at 2:59 PM
Printed on 6 3 97 at 11:02 AM

History

"Disk Print.vi History"
Current Revision: 8

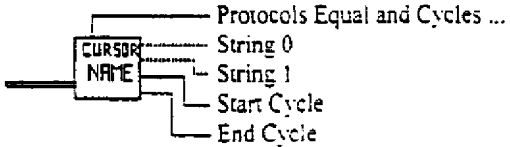
【図７１】

図７１

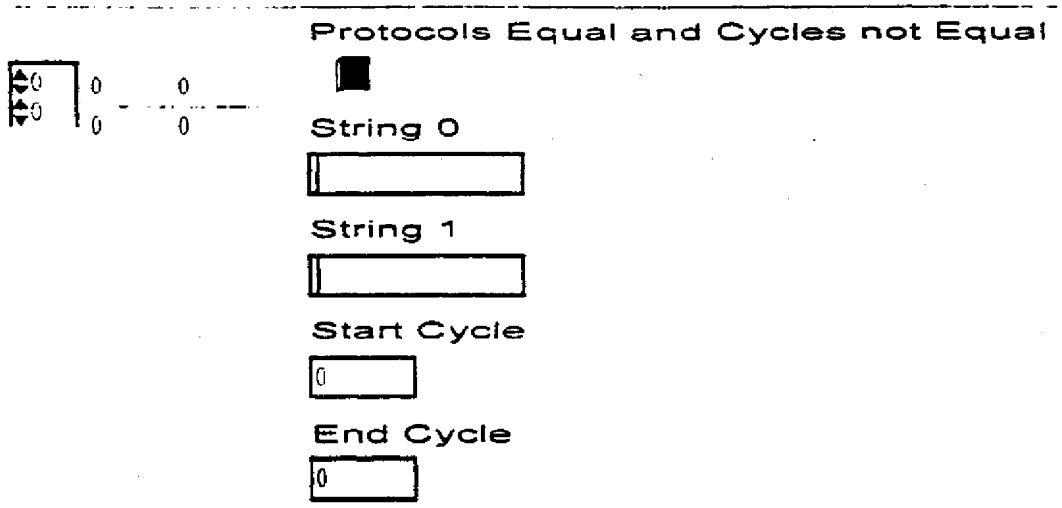
Page 1 CURSOR NAME

Cursor Name.vi
Last modified on 5/11/97 at 5:20 PM
Printed on 6/3/97 at 11:02 AM

Connector Pane



Front Panel



Controls and Indicators

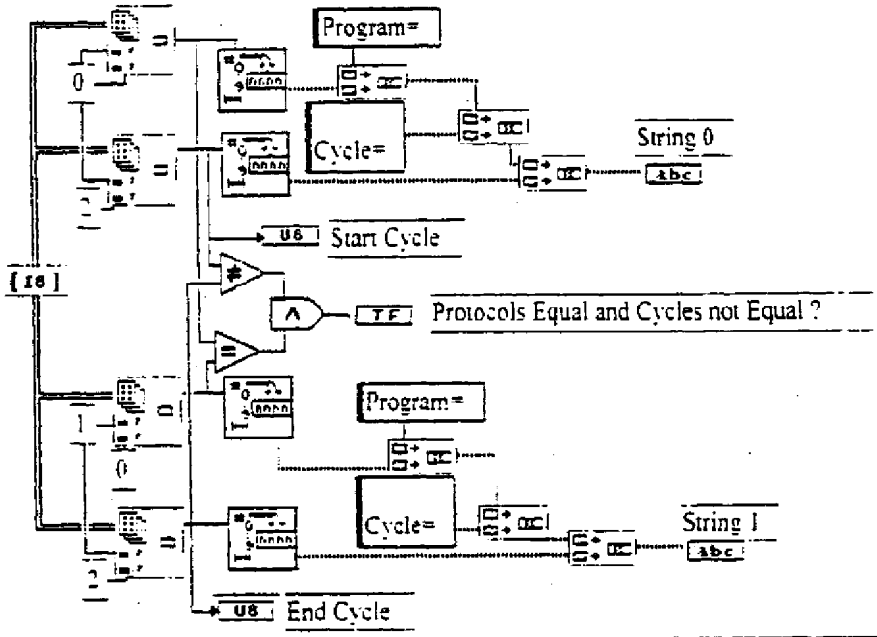
- String 0
- String 1
- Protocols Equal and Cycles not Equal?
- Start Cycle
- End Cycle

【図７２】

図７２

Cursor Name.vi
Last modified on 5/11/97 at 5:20 PM
Printed on 6/3/97 at 11:02 AM

Block Diagram



Position in Hierarchy





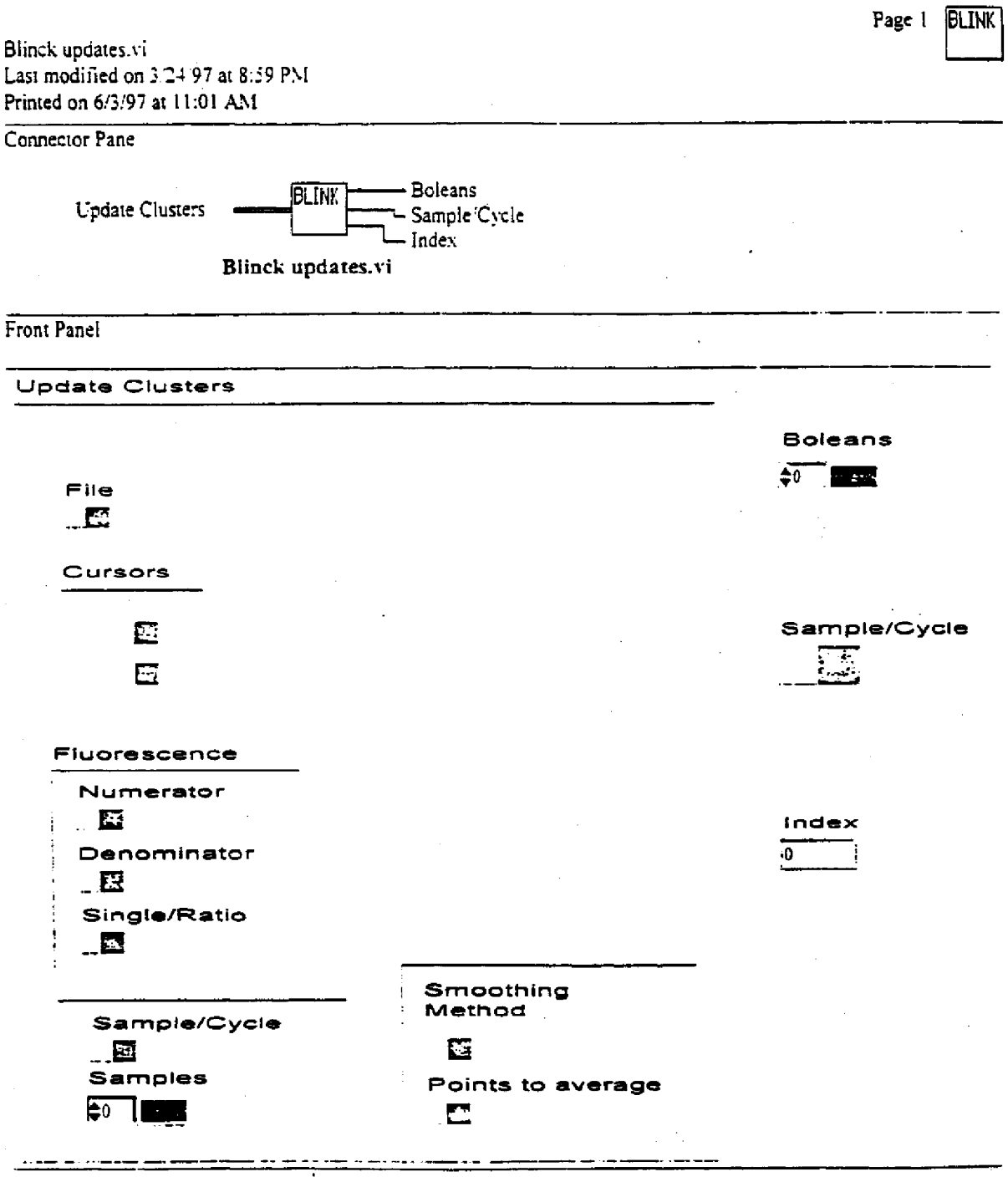
List of SubVIs

History

"Cursor Name.vi History"
Current Revision: 21

【図７３】

図７３


Page 1
BLINK
Blinck updates.vi
Last modified on 3/24/97 at 8:59 PM
Printed on 6/3/97 at 11:01 AM
Connector Pane
Update Clusters
BLINK
Boleans
Sample/Cycle
Index
Blinck updates.vi
Front Panel
Update Clusters
Boleans
File
Cursors
Sample/Cycle
Fluorescence
Numerator
Denominator
Single/Ratio
Index
Sample/Cycle
Samples
Smoothing Method
Points to average

【図７４】

図７４

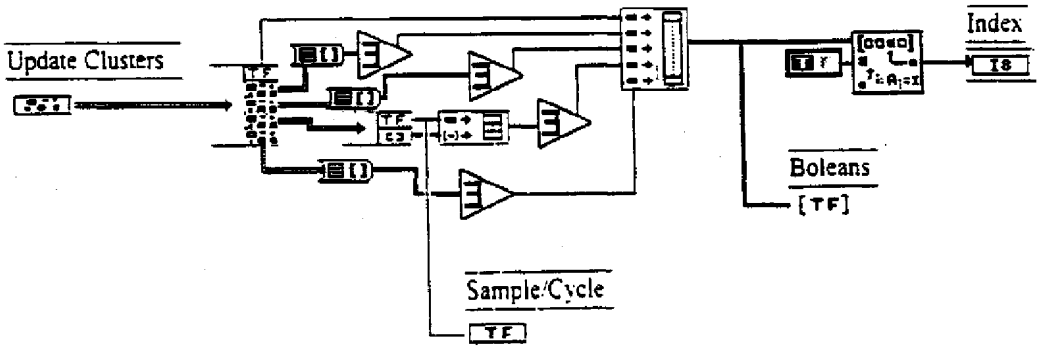
Page 2 BLINK

Blinck updates.vi
Last modified on 3/24/97 at 8:59 PM
Printed on 6/3/97 at 11:01 AM

Controls and Indicators

- Update Clusters
 - File
 - Cursors
 -
 -
 - Fluorescence
 - Numerator
 - Denominator
 - Single/Ratio
 -
 - Sample/Cycle
 - Samples
 -
 -
 - Smoothing Method
 - Points to average
- Index
- Boleans
 -
- Sample/Cycle

Block Diagram



【図７５】

図７５

Page 3 BLINK

Blinck updates.vi
Last modified on 3/24/97 at 8:59 PM
Printed on 6/3/97 at 11:01 AM

Position in Hierarchy





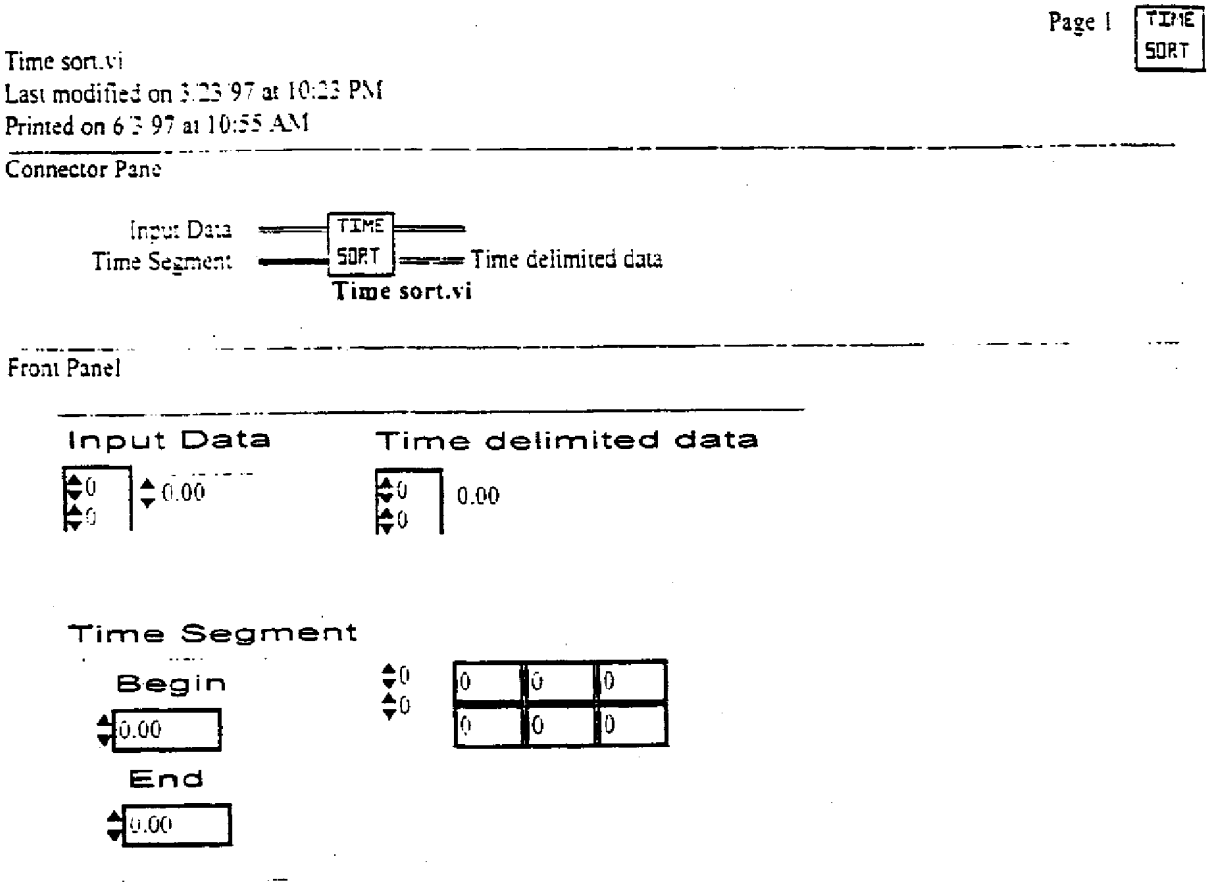
List of SubVIs

History

"Blinck updates.vi History"
Current Revision: 17

【図７６】

図７６

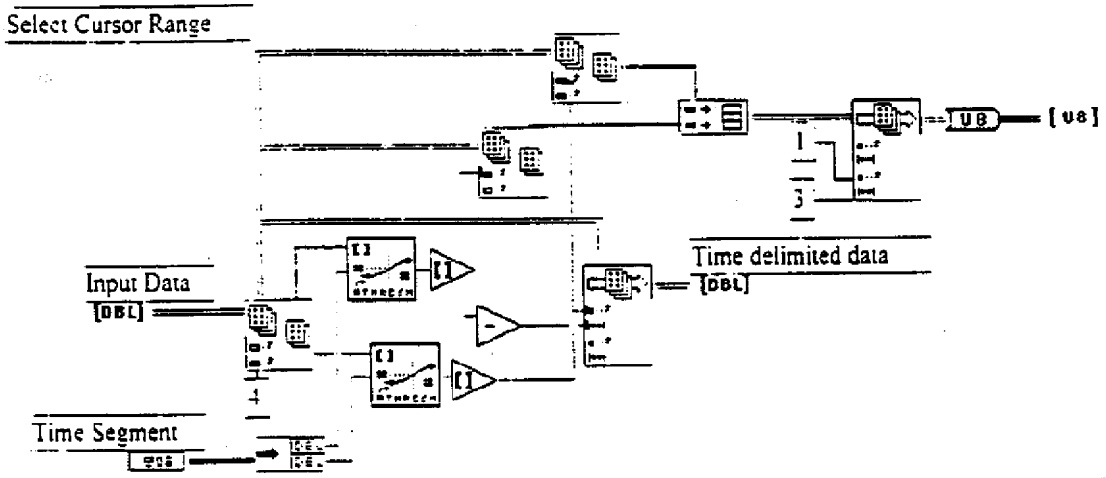

Page 1
TIME SORT
Time sort.vi
Last modified on 3/23/97 at 10:23 PM
Printed on 6/3/97 at 10:55 AM
Connector Pane
Input Data
Time Segment
TIME SORT
Time delimited data
Time sort.vi
Front Panel
Input Data
0.00
Time delimited data
0.00
Time Segment
Begin
0.00
End
0.00
Controls and Indicators
Time Segment
Begin
End
Input Data
Input Data
Time delimited data
DBL
U8

【図７７】

図７７

Time sort.vi
Last modified on 3/23/97 at 10:23 PM
Printed on 6/3/97 at 10:55 AM

Block Diagram



Position in Hierarchy





List of SubVIs

History

"Time sort.vi History"
Current Revision: 13

【図７８】

図７８

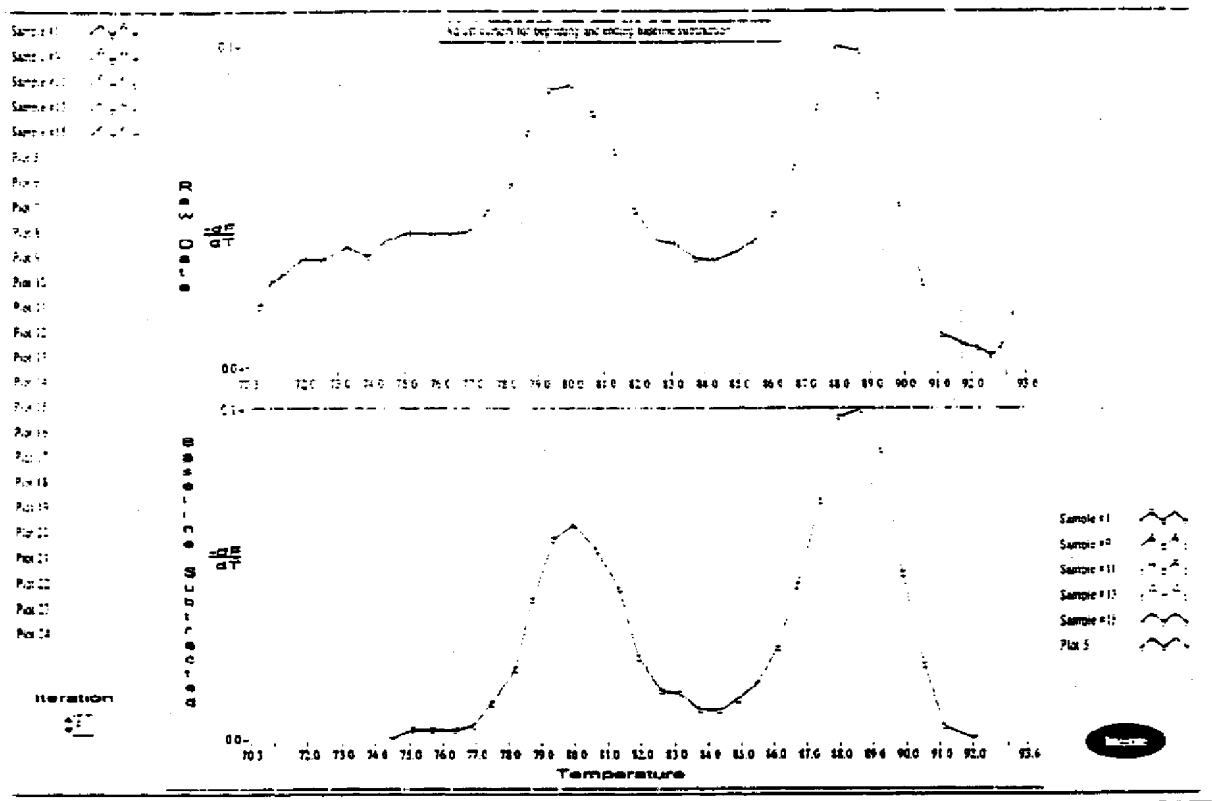
Page 1

Background.vi
Last modified on 6/3/97 at 11:07 AM
Printed on 6/3/97 at 11:07 AM

Connector Pane



Front Panel



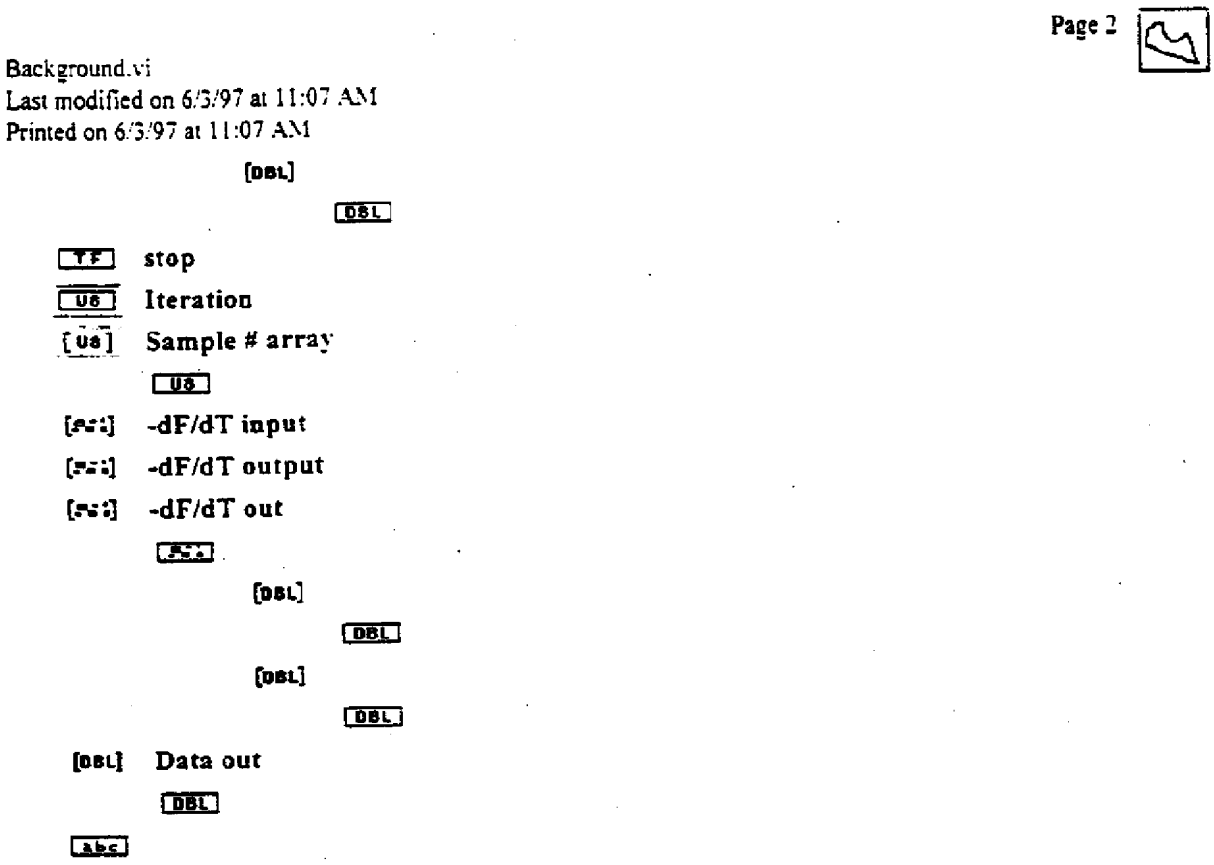
Controls and Indicators

[ARR] -dF/dT in

[DBL]

【図７９】

図７９

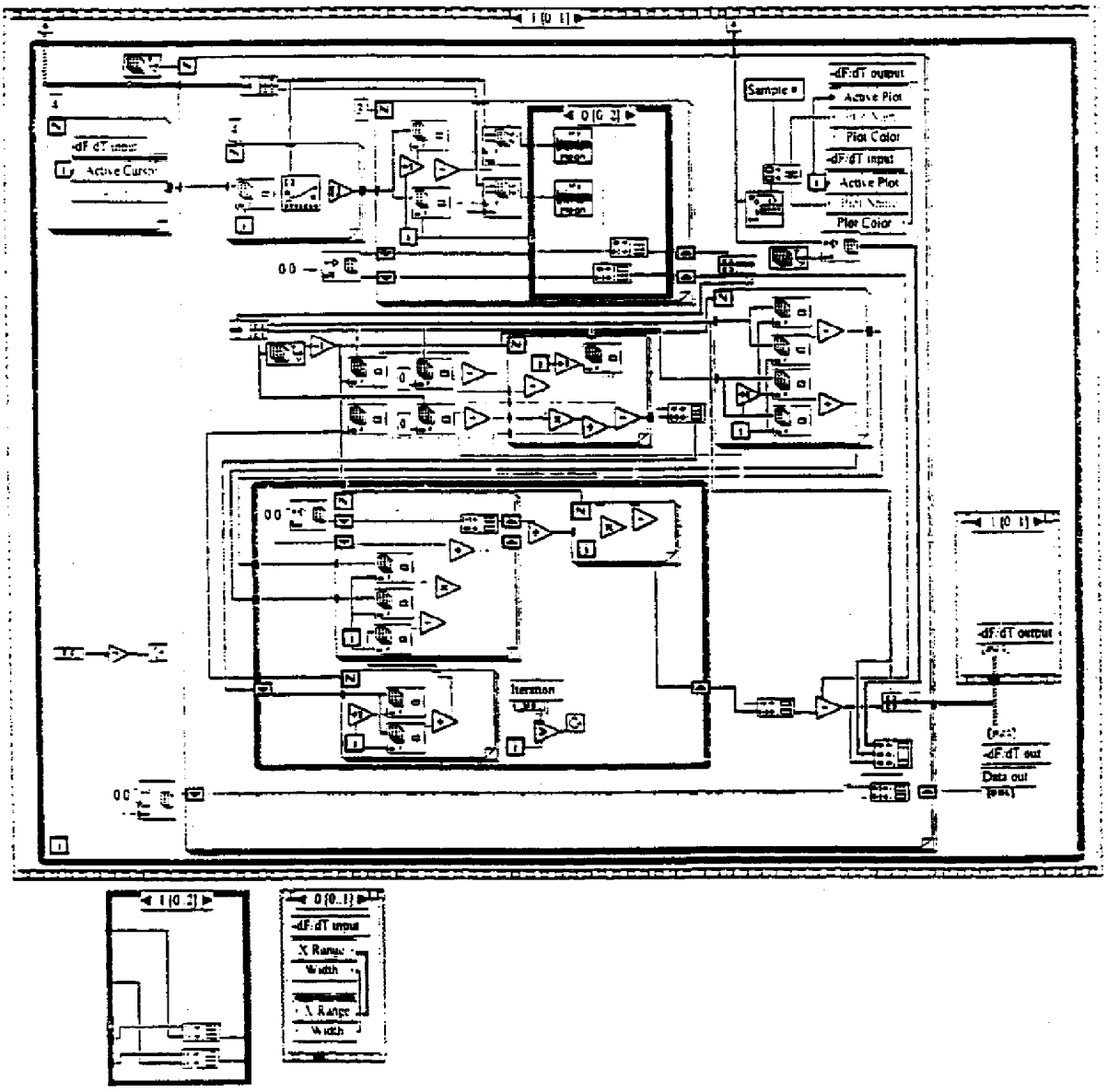

Page 2
Background.vi
Last modified on 6/3/97 at 11:07 AM
Printed on 6/3/97 at 11:07 AM
[DBL]
DBL
TF
stop
U8
Iteration
[U8]
Sample # array
U8
-dF/dT input
-dF/dT output
-dF/dT out
[DBL]
DBL
[DBL]
DBL
[DBL]
Data out
DBL
abc

【図８０】

図８０

Background.vi
Last modified on 6/3/97 at 11:07 AM
Printed on 6/3/97 at 11:07 AM

Block Diagram

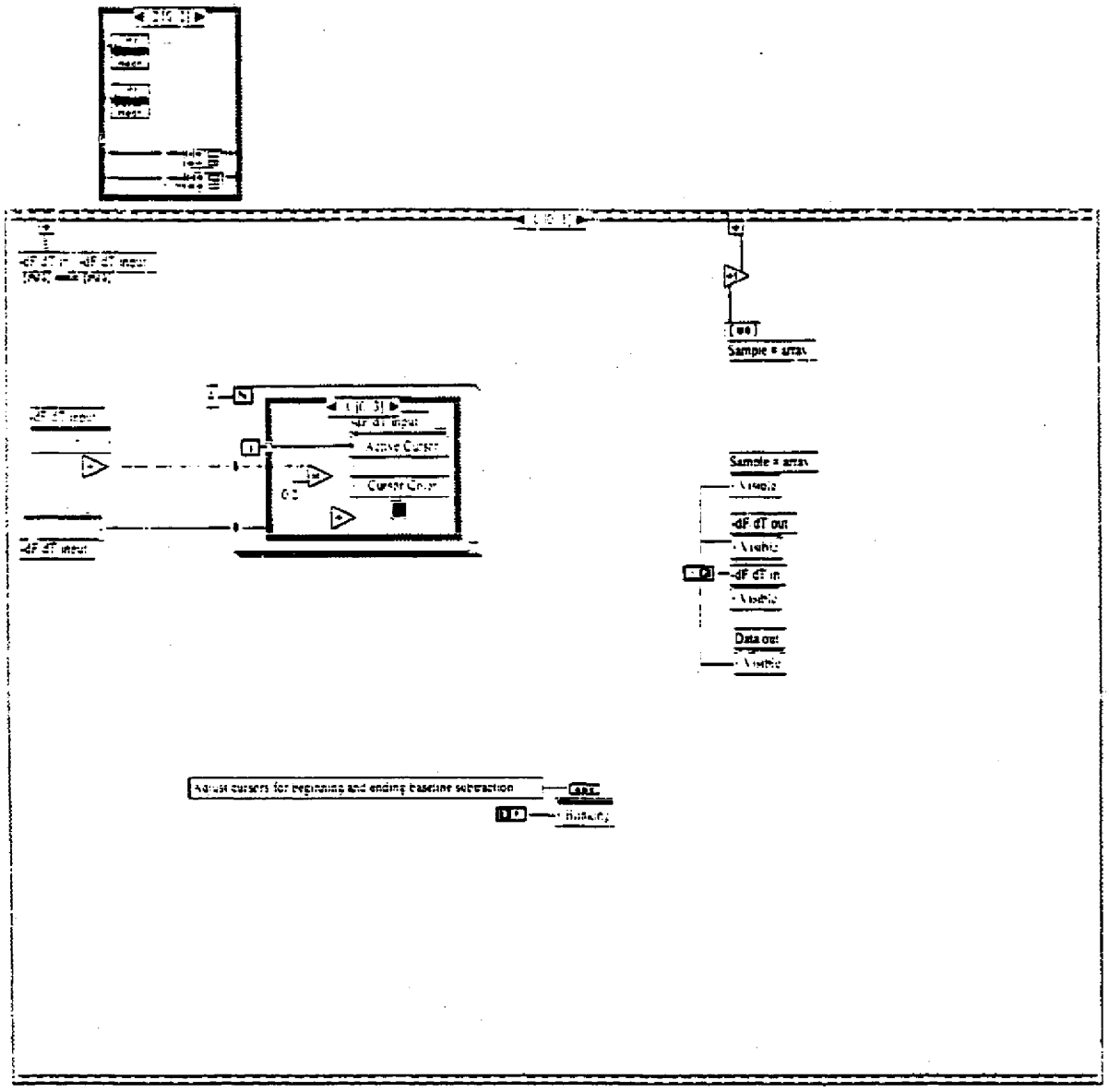


【図８１】

図８１

Page 4

Background.vi
Last modified on 6/3/97 at 11:07 AM
Printed on 6/3/97 at 11:07 AM

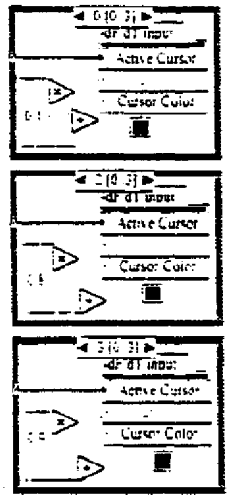


【図８２】

図８２

Page 5

Background.vi
Last modified on 6/3/97 at 11:07 AM
Printed on 6/3/97 at 11:07 AM



Position in Hierarchy







List of SubVIs



Mean.vi
C:\LABVIEW\vi.lib\ANALYSIS\5stat.llb\Mean.vi

History

【図８３】

図８３

Background.vi
Last modified on 6/3/97 at 11:07 AM
Printed on 6/3/97 at 11:07 AM

"Background.vi History"
Current Revision: 58

【図８４】

図８４

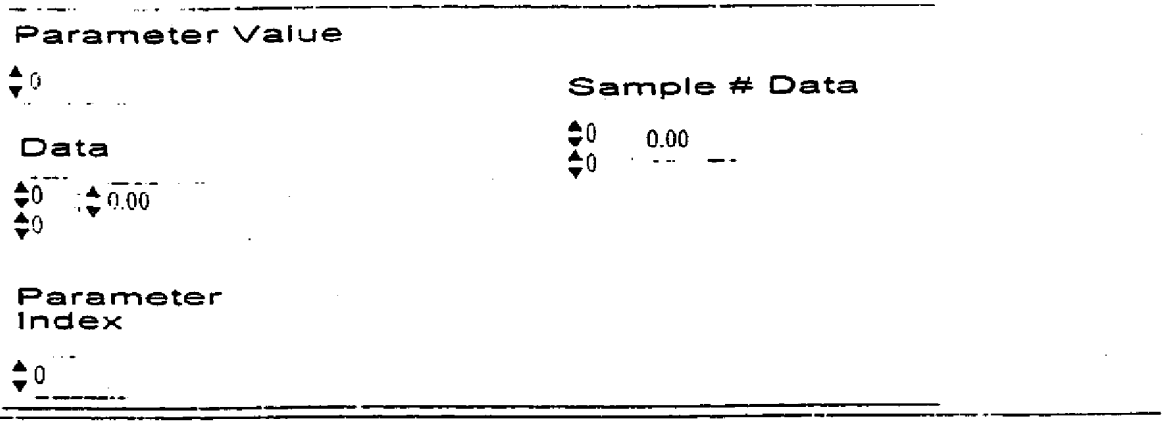
Page 1

Sample Number Sorting.vi
Last modified on 3/23/97 at 10:23 PM
Printed on 6/3/97 at 11:07 AM

Connector Pane



Front Panel



Controls and Indicators

[DBL] **Data**

DBL

U8 **Parameter Value**

U8 **Parameter Index**

[DBL] **Sample # Data**

DBL

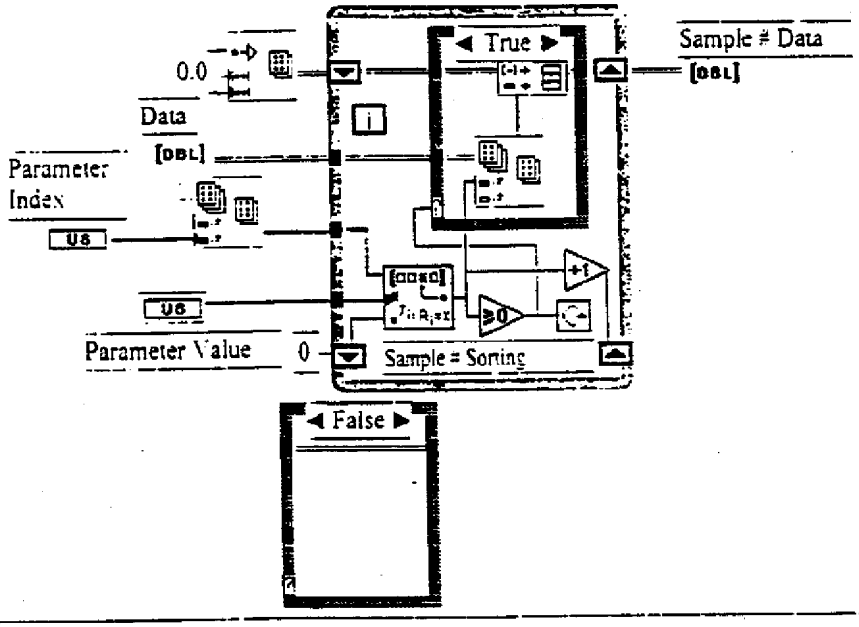
【図８５】

図８５

Page 2

Sample Number Sorting.vi
Last modified on 3/23/97 at 10:23 PM
Printed on 6/3/97 at 11:07 AM

Block Diagram



Position in Hierarchy



List of SubVIs

History

"Sample Number Sorting.vi History"
Current Revision: 14

【図８６】

図８６

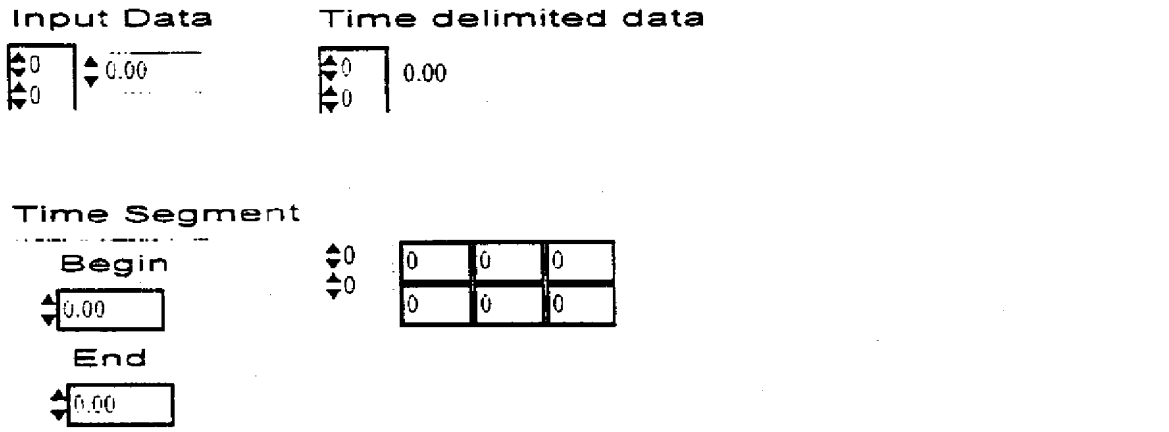
Page 1

Time sort.vi
Last modified on 3/23/97 at 10:23 PM
Printed on 6/3/97 at 11:08 AM

Connector Pane



Front Panel



Controls and Indicators

- Time Segment
 - Begin
 - End
- Input Data
 - Input Data
- Time delimited data

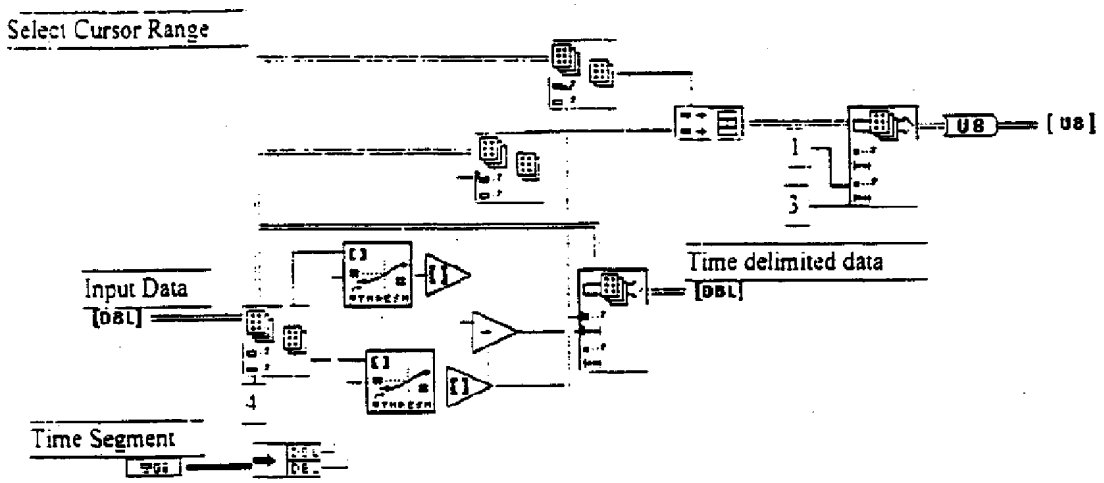
【図８７】

図８７

Page 2 TIME SORT

Time sort.vi
Last modified on 3/23/97 at 10:23 PM
Printed on 6/3/97 at 11:08 AM

Block Diagram



Position in Hierarchy





List of SubVIs

History

"Time sort.vi History"
Current Revision: 13

【図８８】

図８８

Page 1

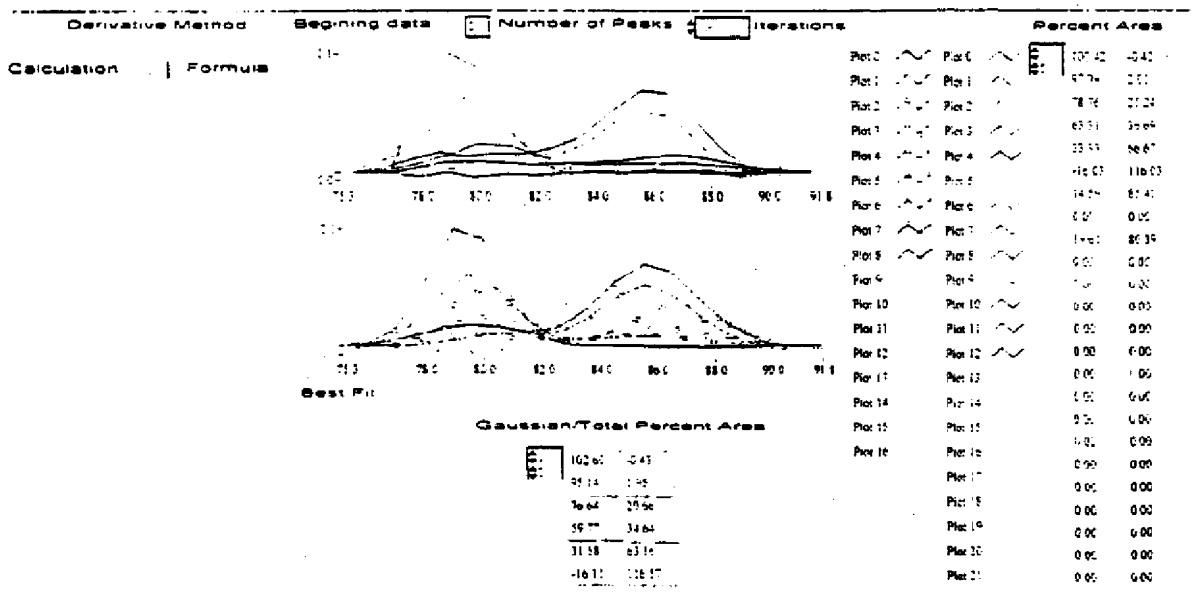
Sum of gaussians.vi
Last modified on 5/19/97 at 1:14 PM
Printed on 6/3/97 at 11:08 AM

Connector Pane

-dF dT in

Sum of gaussians.vi

Front Panel



Controls and Indicators

[SGL] **-dF/dT in**

[DBL]

[DBL]

[DBL]

[DBL]

[U16] **Iterations**

[TF] **Derivative Method**

[SGL] **Begining data**

【図８９】

図８９

Sum of gaussians.vi
Last modified on 5/19/97 at 1:14 PM
Printed on 6/3/97 at 11:08 AM

Best Fit

Number of Peaks

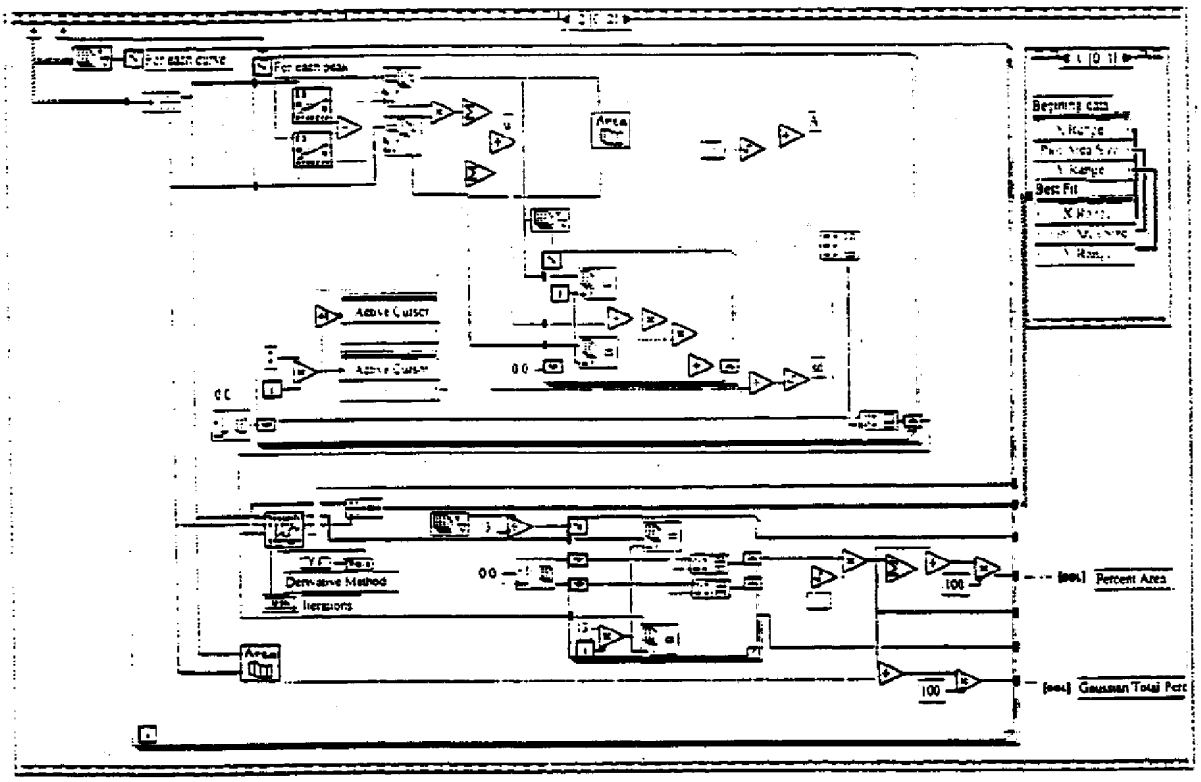
Percent Area

DBL

Gaussian/Total Percent Area

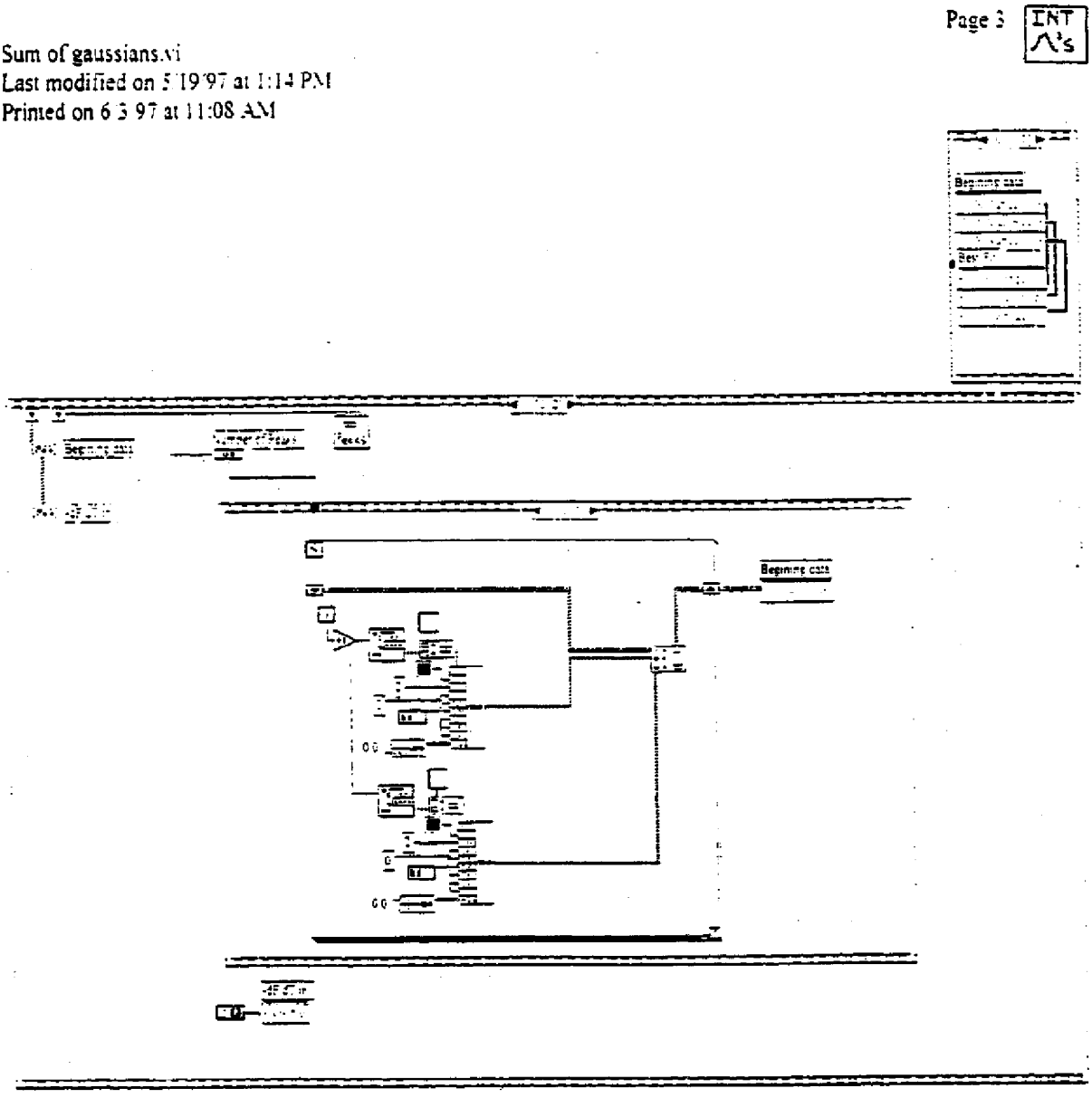
DBL

Block Diagram



【図９０】

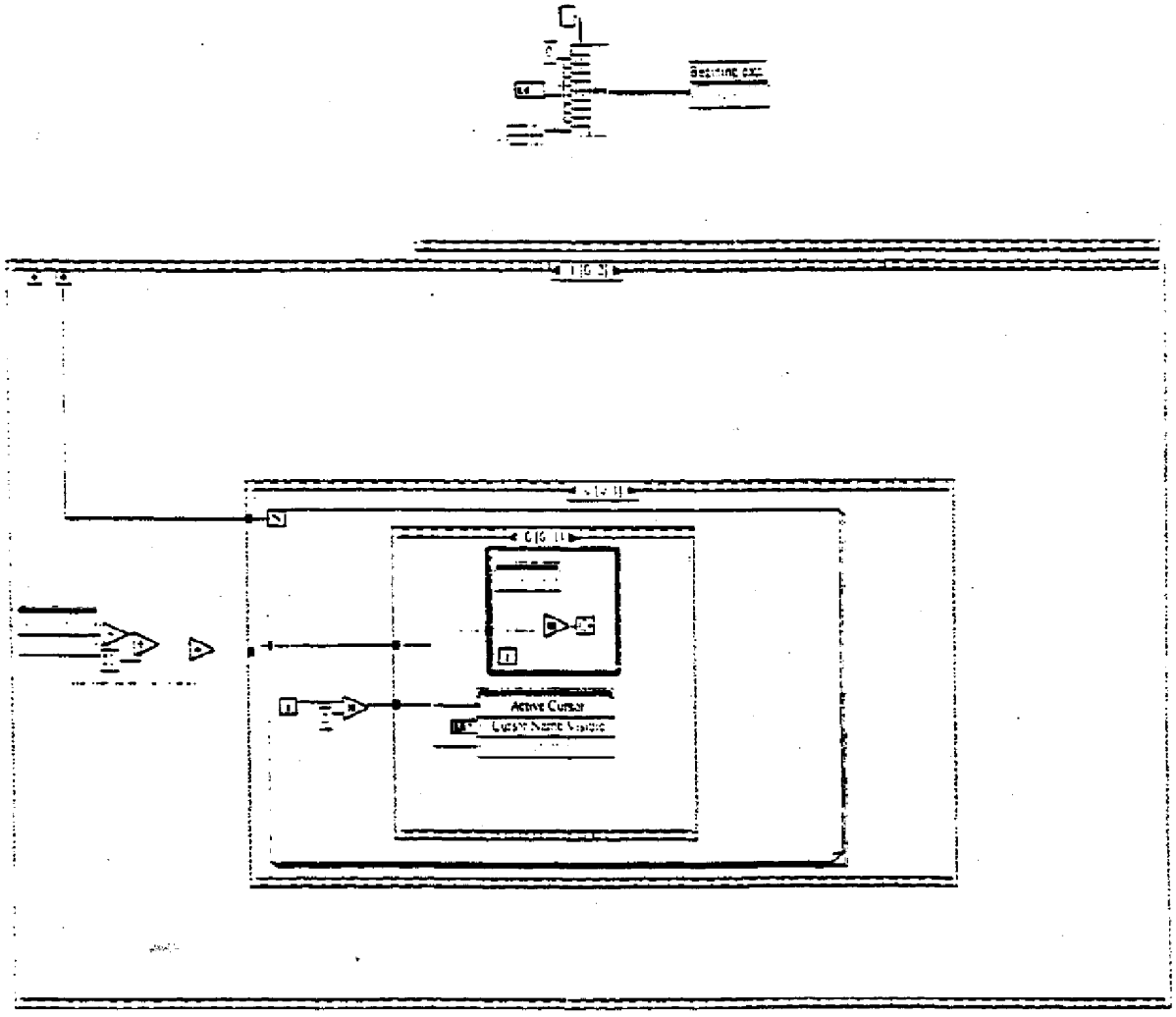
図９０


Page 3
Sum of gaussians.vi
Last modified on 5/19/97 at 1:14 PM
Printed on 6/3/97 at 11:08 AM

【図９１】

図９１

Sum of gaussians.vi
Last modified on 5/19/97 at 1:14 PM
Printed on 6/3/97 at 11:08 AM

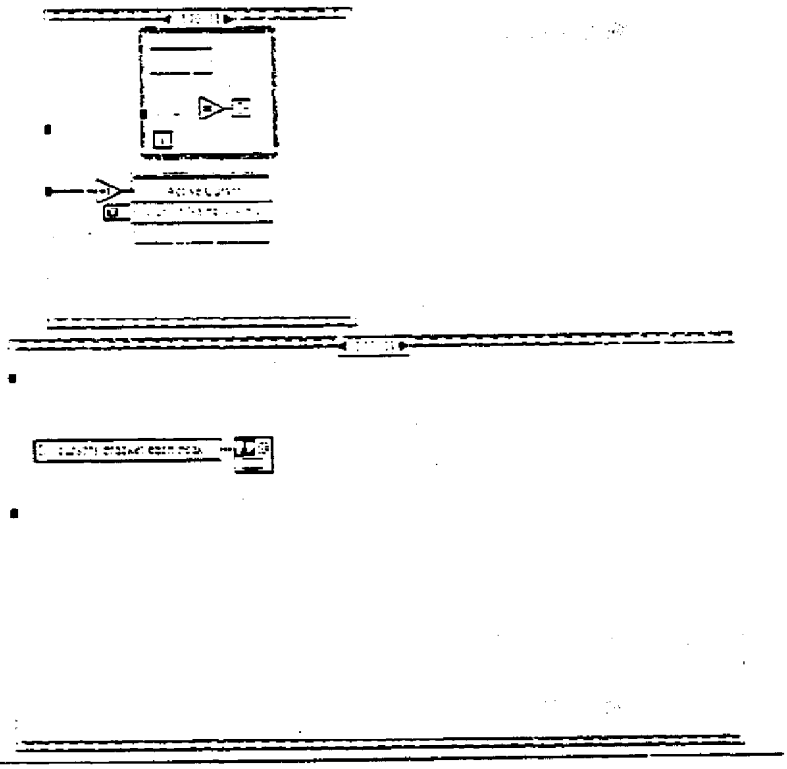


【図９２】

図９２

Page 5 INT A's

Sum of gaussians.vi
Last modified on 5/19/97 at 1:14 PM
Printed on 6/3/97 at 11:08 AM



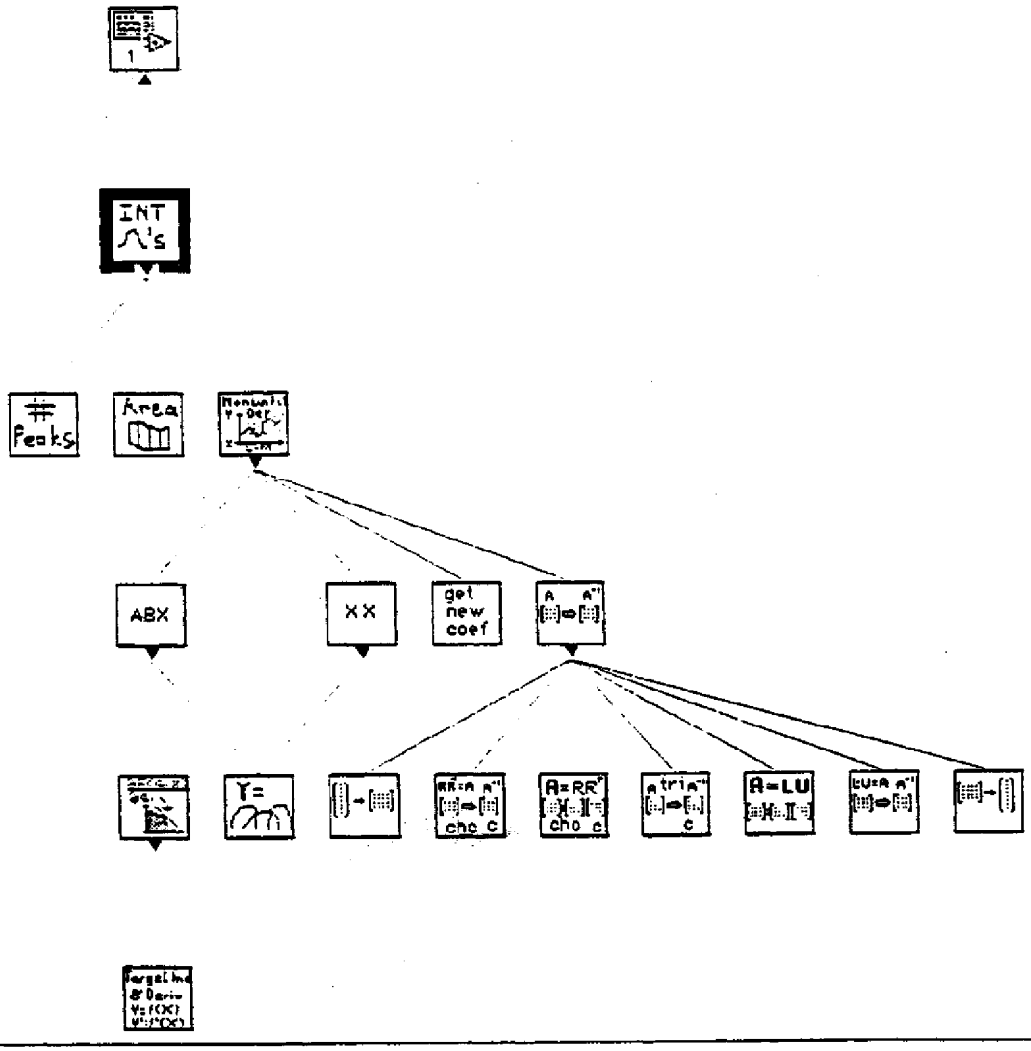
Position in Hierarchy

【図９３】

図９３

Page 6

Sum of gaussians.vi
Last modified on 5/19/97 at 1:14 PM
Printed on 6/3/97 at 11:08 AM



List of SubVIs

Fit sum of gaussians.vi
C:\data 1\Fit sum of gaussians.vi

Peak#.vi
C:\data 1\Peak#.vi

Trapezoid area.vi
C:\data 1\Trapezoid area.vi

【図９４】

図９４

Sum of gaussians.vi
Last modified on 5 19 97 at 1:14 PM
Printed on 6 3 97 at 11:08 AM

History

"Sum of gaussians.vi History"
Current Revision: 35

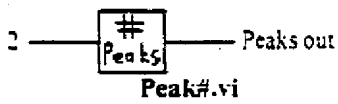
【図９５】

図９５

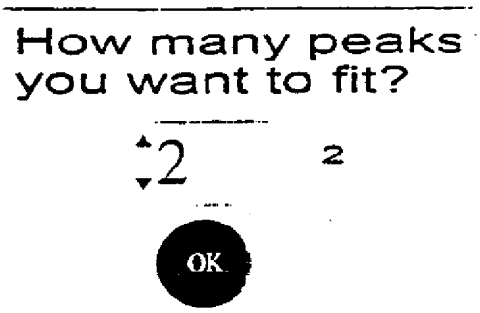
Page 1

Peak#.vi
Last modified on 4/16/97 at 7:31 PM
Printed on 6/3/97 at 11:09 AM

Connector Pane



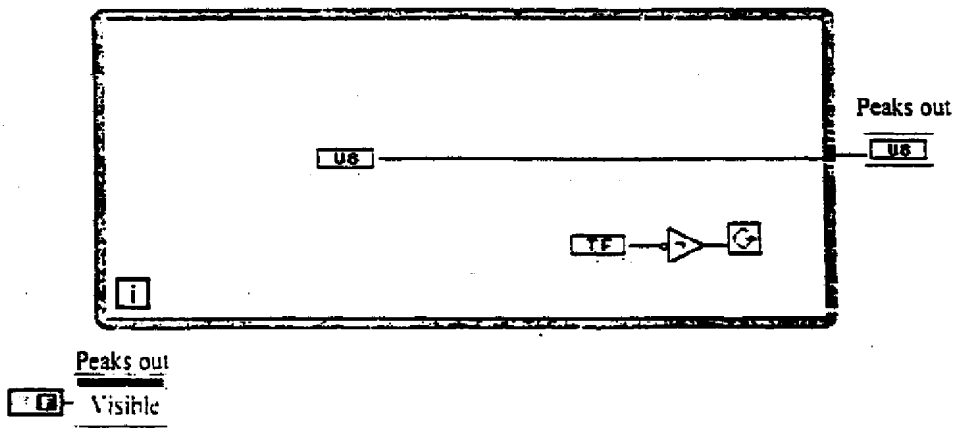
Front Panel



Controls and Indicators

U8 2
TF stop
U8 Peaks out

Block Diagram



【図９６】

図９６

Page 2

Peak#.vi
Last modified on 4 16 97 at 7:31 PM
Printed on 6 3 97 at 11:09 AM

Position in Hierarchy







List of SubVIs

History

"Peak#.vi History"
Current Revision: 8

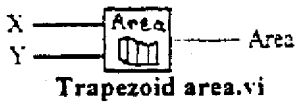
【図９７】

図９７

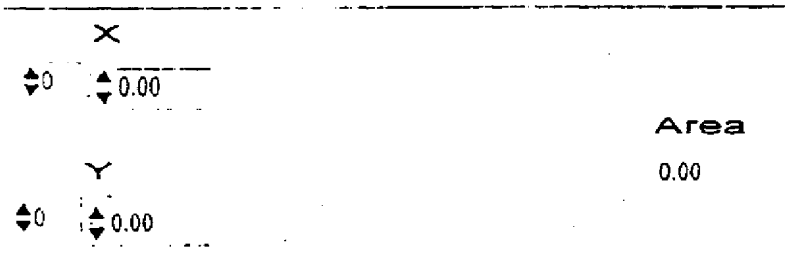
Page 1

Trapezoid area.vi
Last modified on 4/24/97 at 9:26 PM
Printed on 6/3/97 at 11:09 AM

Connector Pane



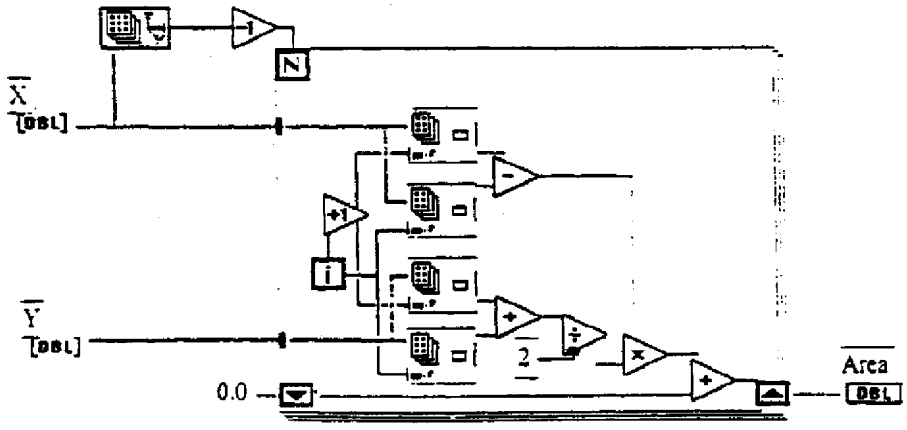
Front Panel



Controls and Indicators

[DBL] Y
DBL
[DBL] X
DBL
DBL Area

Block Diagram



【図９８】

図９８

Trapezoid area.vi
Last modified on 4 24 97 at 9:26 PM
Printed on 6 3 97 at 11:09 AM

Position in Hierarchy

List of SubVIs

History

"Trapezoid area.vi History"
Current Revision: 3

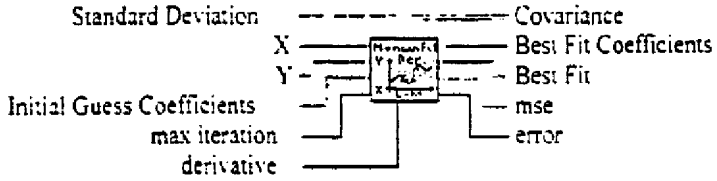
【図９９】

図９９

Page 1

Fit sum of gaussians.vi
Last modified on 5/16/97 at 12:24 AM
Printed on 6/3/97 at 11:11 AM

Connector Pane



Fit sum of gaussians.vi

【図１００】

図１００

Fit sum of gaussians.vi
Last modified on 5/16/97 at 12:24 AM
Printed on 6/3/97 at 11:11 AM

NonLinear Lev-Mar Fit:

This VI uses the Levenberg-Marquardt algorithm to determine the least squares set of coefficients that best fit the set of input data points(X,Y) as expressed by a nonlinear function y=f(x,a) where a is the set of coefficients. This VI also gives the best fit curve y=f(x,a).

The user needs to open a sub-VI "Target Fnc & Deriv NonLin" and inputs his/her nonlinear function f(x,a) in the Formula Node. If the user choose formula caculation for derivative method, he/she needs to input the partial deriative of f(x,a) with respect to a as well.

Inputs:
X: experiment data points.
Y: experiment data points.
Standard Deviation: standard deviation of each experiment data.If you don't have knowledge about this parameter, just leave it empty.
Initial Guess Coefficients: Your guessed coefficients. If this is too far from the appropriate coefficients, the VI maybe will fail to return the appropriate coeficients and best fit curve.
max iteration: max iteration the algrothim will try. If it can not converge when it reaches the max iteration. The VI will return an error.
derivative: There are two ways to caculate the partial derivative of f(x,a) with respect to coefficients a. If you choose nemerical caculation, the VI will use numerical method to caculate them internally. If you choose formula caculation, you need to input the derivative formula in the subvi Target Fnc & Deriv NonLin. formula caculation is more precise than numerical caculation.

Outputs:
Best Guess Coefficients: the least squares coefficients.
Best Fit: the best fit curve f(x,a).
Covariance: covariance matrix of Best Guess Coefficients.
mse: mse=1/n*sum[(y(i)-f(x(i),a))/std(i)]^2)
(std: Standard Deviation)

【図１０１】

図１０１

Page 3

Fit sum of gaussians.vi
Last modified on 5/16/97 at 12:24 AM
Printed on 6/3/97 at 11:11 AM

Front Panel

Nonlinear Lev-Mar Fit

X
0 0.00

Y
0 0.00

Standard Deviation
0 0.00

Initial Guess Coefficients
0 0.00

max iteration
200

derivative
numerical

Best Fit Coefficients
0 0.00

Best Fit
0 0.00

Covariance
0 0.00
0

mse
0.0000E-0

error
0

Controls and Indicators

[DBL] **X**
X is the array of data points representing the independent variable x.

DBL X is the input array of data points representing the dependent variable x.

[DBL] **Y**
Y is the array of data points representing the observed values of the dependent variable y.

DBL

[DBL] **Initial Guess Coefficients**
Initial Guess Coefficients is your initial guess of the solution coefficients.

DBL

【図１０２】

図１０２

Fit sum of gaussians.vi
Last modified on 5/16/97 at 12:24 AM
Printed on 6/3/97 at 11:11 AM

[I32] **max iteration**
max iteration is the maximum executing iterations used in the nonlinear fit algorithm.

If max iterations is exceeded and a solution is not found, this VI will return an error. At that point, you must increase max iterations, adjust the Initial Guess Coefficients, or change the target function.

[◆] **derivative**
derivative is used to specify the method used to calculate the Jacobian.

0: numerical approximation
1: formula evaluation - you must specify the formula for the Jacobian in the Target Fnc & Deriv NonLin VI diagram.

[DBL] **Standard Deviation**
Standard Deviation is the array of standard deviations, sigma[i], for data point (x[i],y[i]).

If the standard deviations are all equal or if they are unknown, leave this control unwired and the standard deviations will be set to 1.0.

[DBL]

[DBL] **Best Fit Coefficients**
Best Fit Coefficients is the array of coefficients that minimize the chi-square error between the solution vector and the observed Y values.

[DBL]

[DBL] **Best Fit**
Best Fit is the fitted data z[i] = f(x[i],A), where A is the set of Best Fit Coefficients.

[DBL]

[DBL] **mse**
mse is the chi-squared error between the Best Fit and the observed Y values.

[I32] **error**
You can wire this output to the Find First Error VI to produce an error cluster. This cluster can then be wired to the Simple Error Handler VI or the General Error Handler VI for an immediate report on any errors. You can also look up error codes in the Error Codes Appendix in the LabVIEW Cross Reference Manual.

[DBL] **Covariance**
Covariance is the matrix of covariances C.

c[j,k] is the covariance between a[j] and a[k], and c[j,j] is the variance of a[j].

【図１０３】

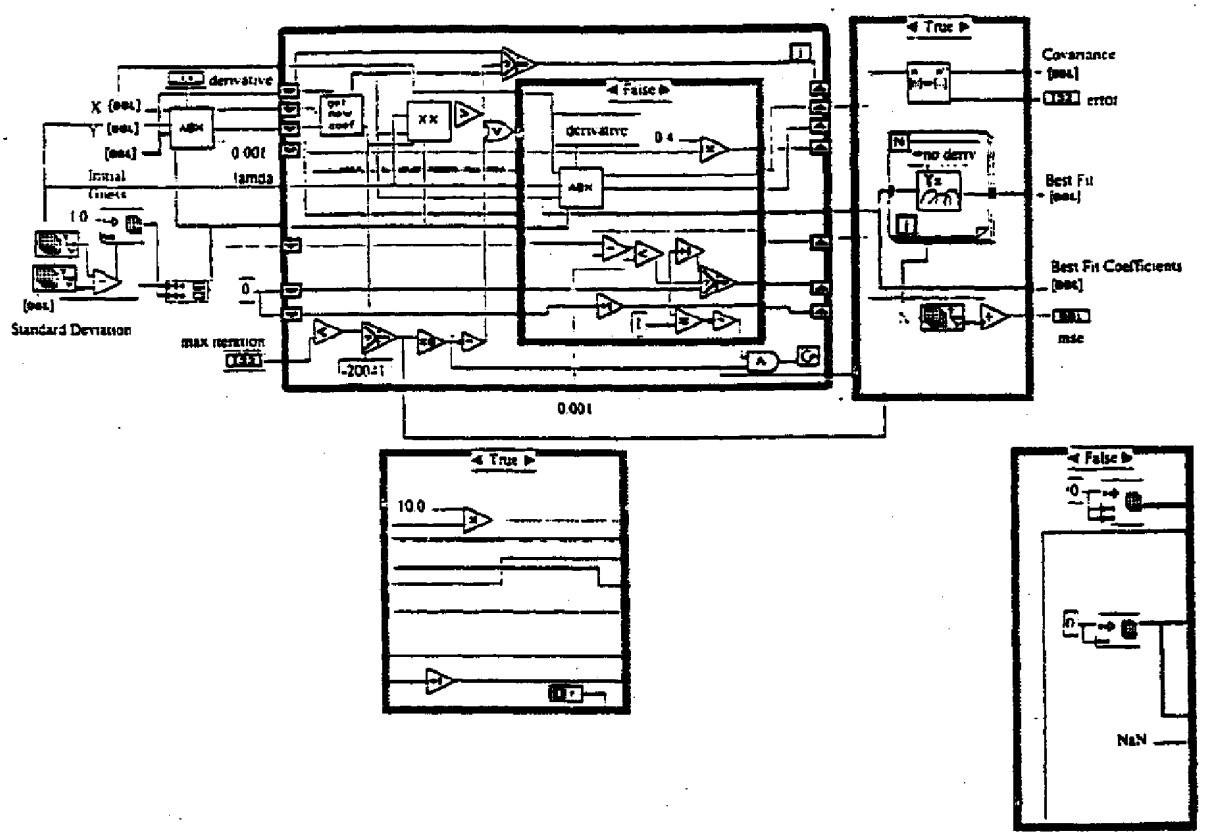
図１０３

Page 5

Fit sum of gaussians.vi
Last modified on 5/16/97 at 12:24 AM
Printed on 6/3/97 at 11:11 AM

DBL

Block Diagram

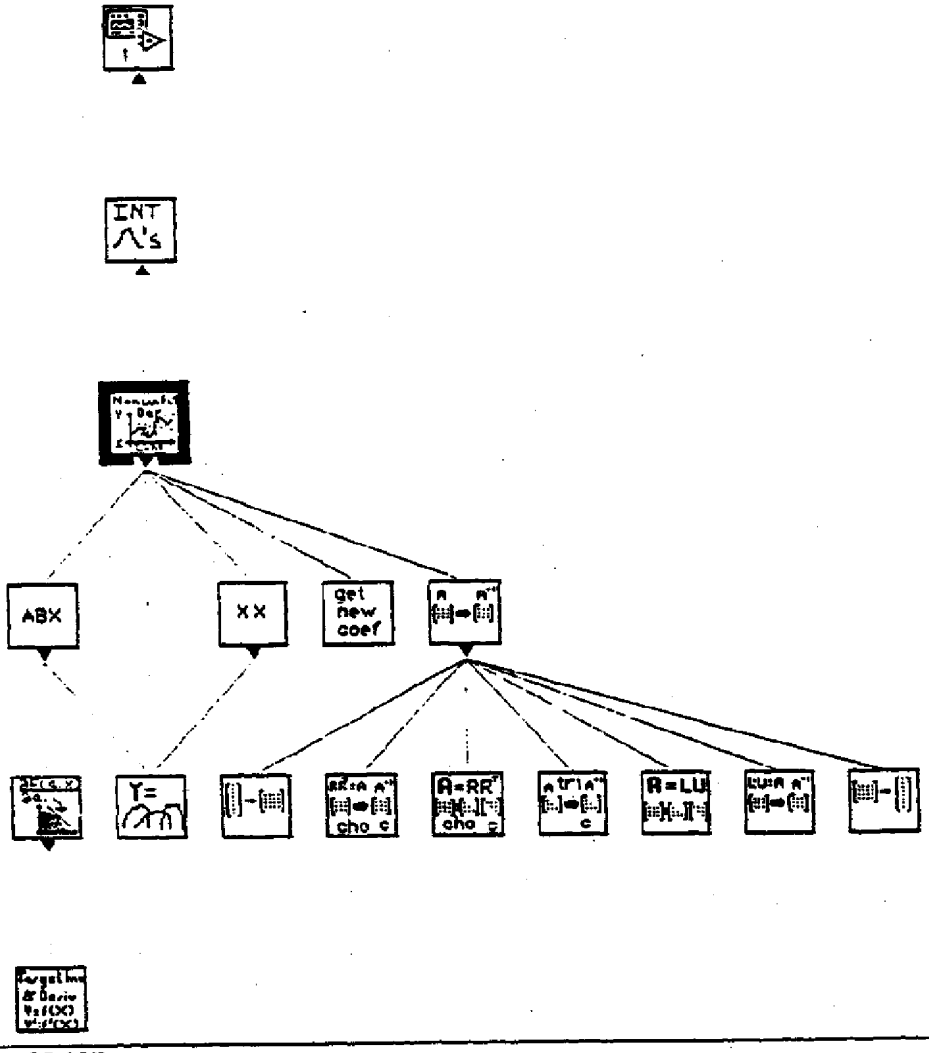


Position in Hierarchy

【図１０４】

図１０４

Fit sum of gaussians.vi
Last modified on 5/16/97 at 12:24 AM
Printed on 6/3/97 at 11:11 AM



List of SubVIs

Inverse Matrix.vi
C:\LABVIEW\vi.lib\Analysis\7linalg.llb\Inverse Matrix.vi

get new coefficients.vi
C:\LABVIEW\vi.lib\Analysis\6fits.llb\get new coefficients.vi

Gauss Lev-Mar abx.vi
C:\data 1\Gauss Lev-Mar abx.vi

【図１０５】

図１０５

Fit sum of gaussians.vi
Last modified on 5/16/97 at 12:24 AM
Printed on 6/3/97 at 11:11 AM

Gauss Lev-Mar xx.vi
C:\data 1\Gauss Lev-Mar xx.vi

Sum of gausians.vi
C:\data 1\Sum of gausians.vi

History

"Fit sum of gaussians.vi History"
Current Revision: 26
rev. 8 Sun, Sep 25, 1994 1:48:18 PM greggf
VI was converted from LabVIEW version 3.1b1 to LabVIEW version 3.1.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/US 97/10008

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12Q1/68 G01N33/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	EP 0 566 751 A (HOFFMANN LA ROCHE) 27 October 1993 see the whole document ---	6,7,30, 34 1-5,22, 55,56
X Y	EP 0 229 943 A (MOLECULAR BIOSYSTEMS INC) 29 July 1987 see the whole document ---	15-21 1-5,22, 55,56
Y	WO 96 00901 A (UNIV CALIFORNIA) 11 January 1996 see the whole document ---	1-5,22, 55,56, 118,119
Y	WO 95 32306 A (BIOTRONICS CORP.) 30 November 1995 see the whole document ---	1-5,22, 55,56
	-/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 October 1997	18. 11. 97

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Osborne, H

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter nal Application No
PCT/US 97/10008

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 95 13399 A (PUBLIC HEALTH RESEARCH INST OF) 18 May 1995 see the whole document	1-5,22, 55,56
Y	WO 95 30139 A (PERKIN ELMER CORP) 9 November 1995 see page 9, line 20 - page 14	1-5,22, 55,56, 118,119
X	EP 0 640 828 A (HOFFMANN LA ROCHE) 1 March 1995 cited in the application	28,29, 57-60, 114,115, 120-123
A	see the whole document	9-14, 63-67, 81-86, 110,111
X	EP 0 686 699 A (PERKIN ELMER CORP) 13 December 1995	28,29, 57-60, 114,115, 120-123
A	see the whole document	9-14, 63-67, 81-86, 110,111
X	EP 0 643 140 A (CANON KK) 15 March 1995	28,29, 57-60, 114,115, 120-123
A	see the whole document	9-14, 63-67, 81-86, 110,111
A	COTTON R G H: "DETECTION OF SINGLE BASE CHANGES IN NUCLEIC ACIDS" THE BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 263, 1 October 1989, pages 1-10, XP000400720 see page 3, paragraph 3 - paragraph 4	2,35-51
X	WITTWER C ET AL: "Rapid cycle amplification, pages 174-181; in PCR: Polymerase chain reaction, (ED.) Mullis K B., F. Ferre and R. A. Gibbs" 1994 , BIRKHAEUSER BOSTON, INC , NEW YORK, NEW YORK, USA XP002044531 see the whole document	9,10,28, 29, 57-60, 114,115, 120-123

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter ional Application No
PCT/US 97/10008

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0566751 A	27-10-93	CA 2090904 A	24-09-93
		DE 69207580 D	22-02-96
		DE 69207580 T	08-08-96
		ES 2082256 T	16-03-96
		IE 72498 B	23-04-97
		JP 6007199 A	18-01-94
		US 5573906 A	12-11-96
EP 0229943 A	29-07-87	CA 1273552 A	04-09-90
		DE 3681272 A	10-10-91
		JP 2033069 C	19-03-96
		JP 7063400 B	12-07-95
		JP 62157570 A	13-07-87
		US 4996143 A	26-02-91
WO 9600901 A	11-01-96	US 5622821 A	22-04-97
		AU 2956795 A	25-01-96
		CA 2193501 A	11-01-96
		EP 0767912 A	16-04-97
		US 5656433 A	12-08-97
		US 5639615 A	17-06-97
WO 9532306 A	30-11-95	AU 6836494 A	18-12-95
		EP 0763133 A	19-03-97
WO 9513399 A	18-05-95	AU 1292195 A	29-05-95
		CA 2176348 A	18-05-95
		EP 0728218 A	28-08-96
		JP 9504950 T	20-05-97
WO 9530139 A	09-11-95	AU 2389695 A	29-11-95
		CA 2159830 A	30-10-95
		EP 0706649 A	17-04-96
		JP 8510562 T	05-11-96
EP 0640828 A	01-03-95	AU 681682 B	04-09-97
		AU 7141494 A	09-03-95
		BR 9403338 A	11-04-95
		CA 2129787 A	28-02-95
		CN 1107892 A	06-09-95

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter nal Application No
PCT/US 97/10008

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0640828 A		CZ 9402078 A	15-11-95
		FI 943936 A	28-02-95
		HU 71622 A	29-01-96
		JP 7163397 A	27-06-95
		NO 943166 A	28-02-95
		PL 304805 A	06-03-95
		ZA 9406330 A	28-02-95
EP 0686699 A	13-12-95	CA 2151065 A	09-12-95
		JP 8066199 A	12-03-96
EP 0643140 A	15-03-95	JP 7163399 A	27-06-95
		CA 2126391 A	14-03-95
		US 5670315 A	23-09-97
		EP 0603783 A	29-06-94
		JP 9040661 A	10-02-97
		JP 7174759 A	14-07-95
		US 5624798 A	29-04-97

フロントページの続き

(81)指定国　　ＥＰ(ＡＴ，ＢＥ，ＣＨ，ＤＥ，ＤＫ，ＥＳ，ＦＩ，ＦＲ，ＧＢ，ＧＲ，ＩＥ，ＩＴ，ＬＵ，ＭＣ，ＮＬ，ＰＴ，ＳＥ)，ＯＡ(ＢＦ，ＢＪ，ＣＦ，ＣＧ，ＣＩ，ＣＭ，ＧＡ，ＧＮ，ＭＬ，ＭＲ，ＮＥ，ＳＮ，ＴＤ，ＴＧ)，ＡＰ(ＧＨ，ＫＥ，ＬＳ，ＭＷ，ＳＤ，ＳＺ，ＵＧ)，ＥＡ(ＡＭ，ＡＺ，ＢＹ，ＫＧ，ＫＺ，ＭＤ，ＲＵ，ＴＪ，ＴＭ)，ＡＬ，ＡＭ，ＡＴ，ＡＵ，ＡＺ，ＢＡ，ＢＢ，ＢＧ，ＢＲ，ＢＹ，ＣＡ，ＣＨ，ＣＮ，ＣＵ，ＣＺ，ＤＥ，ＤＫ，ＥＥ，ＥＳ，ＦＩ，ＧＢ，ＧＥ，ＧＨ，ＨＵ，ＩＬ，ＩＳ，ＪＰ，ＫＥ，ＫＧ，ＫＰ，ＫＲ，ＫＺ，ＬＣ，ＬＫ，ＬＲ，ＬＳ，ＬＴ，ＬＵ，ＬＶ，ＭＤ，ＭＧ，ＭＫ，ＭＮ，ＭＷ，ＮＸ，ＮＯ，ＮＺ，ＰＬ，ＰＴ，ＲＯ，ＲＵ，ＳＤ，ＳＥ，ＳＧ，ＳＩ，ＳＫ，ＴＪ，ＴＭ，ＴＲ，ＴＴ，ＵＡ，ＵＧ，ＵＳ，ＵＺ，ＶＮ，ＹＵ

(72)発明者　ラスマッセン，ランディ，ピー．
アメリカ合衆国・ユタ州　84102―3418・ソルト　レイク　シティ・サウス　900イースト　601

【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第１部門第１区分
【発行日】平成17年2月10日(2005.2.10)

【公表番号】特表2000-509608(P2000-509608A)
【公表日】平成12年8月2日(2000.8.2)
【出願番号】特願平10-500916
【国際特許分類第７版】
　Ｃ１２Ｑ　 1/68
　Ｃ１２Ｎ　15/09
【ＦＩ】
　Ｃ１２Ｑ　 1/68　　Ａ
　Ｃ１２Ｎ　15/00　　ＺＮＡＡ

【手続補正書】
【提出日】平成16年6月3日(2004.6.3)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】補正の内容のとおり
【補正方法】変更
【補正の内容】

手 続 補 正 書

平成１６年 ６月 ３日

特 許 庁 長 官 殿

１．事件の表示

平成１０年特許願第５００９１６号

２．発明の名称

ＰＣＲ中のハイブリダイゼーションのモニタリング

３．補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 アメリカ合衆国・ユタ州 ８４１１２・ソルト レイク シティ
・パーク ビルディング ２１０

名 称 ユニバーシティ オブ ユタ リサーチ ファウンデーション

４．代 理 人

住 所 東京都港区新橋２丁目１２番７号 労金新橋ビル３階
電話３５０８－０３３６（代）

氏 名 （７１２８）弁理士 一 色 健 輔

住 所 同 上

氏 名 （８４９０）弁理士 原 島 典 孝

特許庁 16.6.3 出願支援課 受付

５．補正対象書類名

明細書

６．補正対象項目名

請求の範囲

７．補正の内容

別紙の通り

方式審査 佐藤

請　求　の　範　囲

１．　生物学的サンプルの標的ＤＮＡ配列を分析するための方法であって、

標的配列の隣接部分にハイブリダイゼーションする２つの核酸プローブ存在下に標的配列をポリメラーゼ連鎖反応により増幅するステップであって、

前記プローブの一方は蛍光エネルギー転移対の受容体蛍光物質で標識され、前記プローブの他方は供与体蛍光物質で標識され、

前記標的配列と前記２つのプローブのハイブリダイゼーション時に前記供与体蛍光物質及び受容体蛍光物質が互いに２５ヌクレオチド以内にあり、

前記ポリメラーゼ連鎖反応は

熱安定性ポリメラーゼと前記標的核酸配列に対するプライマーを前記生物学的サンプルに添加するステップと

少なくとも変性温度と伸張温度との間で前記生物学的サンプルを熱サイクルするステップとを含むステップと、

前記供与体蛍光物質によって吸収される波長の光で前記生物学的サンプルを励起して前記蛍光エネルギー転移対からの放射を検出するステップと、

を含む方法。

２．　生物学的サンプルの標的核酸配列を増幅する改良された方法であって、

（ａ）前記生物学的サンプルに核酸結合蛍光体の有効量を添加するステップと、

（ｂ）熱安定性ポリメラーゼ及び前記標的核酸配列に対するプライマーを前記生物学的サンプルに添加するステップと、少なくとも変性温度と伸張温度の間で前記生物学的サンプルを熱サイクルするステップとを含む、所定の初期の温度パラメータ及び時間パラメータを用いるポリメラーゼ連鎖反応によって前記標的核酸配列を増幅するステップであって、

（ｉ）前記ポリメラーゼ連鎖反応中に前記蛍光体によって吸収される、選択された波長の光で前記生物学的サンプルを照射するステップと、

（ｉｉ）前記ポリメラーゼ連鎖反応に最適な温度パラメータ及び時間パラメータを決定するために前記サンプルからの蛍光をモニターするステップと、

（ｉｉｉ）前記検出された蛍光に基づき前記ポリメラーゼ連鎖反応中に前記初期の温度パラメータ及び時間パラメータを調整するステップと、

を含む前記標的核酸配列を増幅するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

３．　フルオレセインで標識した第１のプローブとＣｙ５又はＣｙ５．５で標識した第２のプローブを含むことを特徴とする蛍光エネルギー転移対。

４．　生物学的サンプルにおける標的核酸配列のポリメラーゼ連鎖反応増幅をリアルタイムでモニターする方法であって、

ＳＹＢＲ™グリーンＩ存在下にポリメラーゼ連鎖反応により前記標的配列を増幅するステップであって、前記ポリメラーゼ連鎖反応が、熱安定性ポリメラーゼと前記標的核酸配列に対するプライマーを前記生物学的サンプルに添加するステップと少なくとも変性温度と伸張温度の間で前記生物学的サンプルを熱サイクルするステップとを含むステップと、

ＳＹＢＲ™グリーンＩにより吸収される波長の光で前記生物学的サンプルを励起して前記生物学的サンプルからの放射を検出するステップと、

前記ＳＹＢＲ™グリーンＩからの温度依存性蛍光をモニターするステップと、

を含むことを特徴とする方法。

５．　生物学的サンプルの標的ＤＮＡ配列を分析するための方法であって、

（ａ）核酸プローブと２つの核酸プライマーの有効量を前記生物学的サンプルに添加するステップであって、前記プライマーの一方と前記プローブは各々受容体蛍光物質と供与体蛍光物質を含む蛍光エネルギー転移対の一方の構成要素で標識され、前記標識されたプローブが前記標識されたプライマーの１５ヌクレオチド以内の前記標的核酸配列の増幅コピーとハイブリダイゼーションするステップと、

（ｂ）ポリメラーゼ連鎖反応により前記標的核酸配列を増幅するステップと、

（ｃ）前記供与体蛍光物質によって吸収される選択した波長の光で前記生物学的サンプルを照射して前記サンプルの蛍光放射を検出するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

６．　選択されたポリメラーゼ連鎖反応混合物における増幅生成物の濃度を決定する方法であって、

（ａ）前記増幅生成物の既知の濃度のハイブリダイゼーションの速度をモニターすることにより、選択された温度と反応条件での前記増幅生成物に対する２次速度定数を決定するステップと、

（ｂ）未知の濃度の前記増幅生成物のアニーリング速度を決定するステップと、

（ｃ）前記アニーリング速度と前記２次速度定数から前記増幅生成物の濃度を計算するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

７．　増幅生成物の濃度を求めるために、前記増幅生成物に対する２次速度定数を決定する方法であって、

既知の濃度の前記増幅生成物と有効量の二重鎖特異性蛍光染料とを含む第１のポリメラーゼ連鎖反応混合物の温度を、前記増幅生成物の変性温度以上に上昇させて変性増幅生成物を得るステップと、

前記既知の量の変性増幅生成物を含む前記第１のポリメラーゼ連鎖反応混合物の温度を、前記増幅生成物の変性温度以下の選択された温度まで急速に下げながら、時間の関数として前記第１のポリメラーゼ連鎖反応混合物の蛍光を連続的にモニターするステップと、

前記既知の濃度の増幅生成物に対する極大蛍光、極小蛍光、極小蛍光での時間、２次速度定数を、式

$$F = F_{max} - \frac{F_{max} - F_{min}}{k\ (t - t_0)\ \ [DNA] + 1}$$

（式中、Ｆは蛍光、Ｆmaxは極大蛍光、Ｆminは極小蛍光、ｋは２次速度定数、t_0はＦmin での時間、［ＤＮＡ］は前記増幅生成物の既知の濃度、である。）

から決定するために、時間の関数として蛍光をプロットするステップと、

を含むことを特徴とする方法。

８．　競合的定量ポリメラーゼ連鎖反応による、選択された核酸テンプレートの濃度を決定する方法であって、

（ａ）（ｉ）ポリメラーゼ連鎖反応において前記選択されたテンプレートの選択されたセグメントと競合的テンプレートの前記セグメントに対応する選択されたセグメントとを増幅してこれらの増幅生成物を得るように構成されたオリゴヌクレオチド・プライマーの対の各々の有効量と、

（ｉｉ）蛍光共鳴エネルギー転移対の共鳴エネルギー転移供与体又は共鳴エネルギー転移受容体で標識された有効量のオリゴヌクレオチド・プローブであって、前記プローブが前記競合的テンプレートの増幅生成物から解離する融解温度から識別可能な融解温度での前記選択したテンプレートの増幅生成物から解離するように前記増幅生成物にハイブリダイゼーションするように構成されている、前記オリゴヌクレオチド・プローブと、

（ｉｉｉ）前記プローブと転移オリゴヌクレオチドの間で一方が前記供与体により標識され他方が前記受容体により標識されているとして、前記供与体又は前記受容体で標識された有効量の基準オリゴヌクレオチドであって、前記プローブと前記基準オリゴヌクレオチドの両方が前記増幅生成物にハイブリダイゼーションする時、前記供与体と前記受容体が共鳴エネルギー転移関係になるように前記増幅生成物にハイブリダイゼーションするよう構成された前記基準オリゴヌクレオチドと、

を含む反応混合物において、

ポリメラーゼ連鎖反応により、未知の量の選択されたテンプレートと既知の量の前記競合的テンプレートを増幅して前記増幅生成物を得るステップと、

（ｂ）蛍光共鳴エネルギー転移対による蛍光を顕在化させ、反応混合物の温度が変化して前記選択されたテンプレートの前記増幅生成物から解離する前記プローブの第１の融解曲線と前記競合的テンプレートから解離する前記プローブの第２の融解曲線とを得る時、前記反応混合物を選択された波長の光で照射して温度の関数として蛍光放射を決定するステップと、

（ｃ）前記第１と第２の融解曲線を第１と第２の融解ピークに変換し、当該融解ピークから前記選択されたテンプレートと前記競合的テンプレートの相対量を決定するステップと、

（ｄ）前記既知の量の前記競合的テンプレートと、前記選択されたテンプレート及び競合的テンプレートの相対量とに基づいて前記選択されたテンプレートの濃度を計算するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

９．　ポリメラーゼ連鎖反応において、選択された核酸テンプレートの濃度を決定する方法であって、

（ａ）（ｉ）ポリメラーゼ連鎖反応において、前記選択されたテンプレー

トの選択された第１のセグメントを増幅し、結果として増幅した第１の生成物を得るように構成された第１の対のオリゴヌクレオチド・プライマーの各々の有効量と、

（ｉｉ）ポリメラーゼ連鎖反応において、基準テンプレートの選択された第２のセグメントを増幅し、結果として増幅した第２の生成物を得るように構成された第２の対のオリゴヌクレオチド・プライマーの各々の有効量と、

（ｉｉｉ）核酸結合蛍光染料の有効量と、

を含む反応混合物において、

ポリメラーゼ連鎖反応により、未知の量の前記選択されたテンプレートを増幅し、結果として前記増幅した第１の生成物を得て、且つ既知の量の前記基準テンプレートを増幅し、結果として前記増幅した第２の生成物を得るステップと、

（ｂ）核酸結合蛍光染料による蛍光を顕在化させ、温度の関数として放射された蛍光を連続的にモニターして第１の生成物と第２の生成物が異なる温度で融解するような前記増幅生成物の融解曲線を得るための、選択された波長の光で前記反応混合物を照射するステップと、

（ｃ）前記融解曲線を融解ピークに変換して、当該融解ピークから前記選択されたテンプレートと前記基準テンプレートの相対量を決定するステップと、

（ｄ）前記既知の量の前記基準テンプレートと選択されたテンプレート及び基準テンプレートの相対量とに基づいて前記選択されたテンプレートの濃度を計算するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

１０．　陽性対照テンプレートも含むポリメラーゼ連鎖反応において、選択されたテンプレートの増幅をモニターする方法であって、

（ａ）（ｉ）ポリメラーゼ連鎖反応において、前記選択されたテンプレートの選択された第１のセグメントを増幅し、その結果として増幅した第１の生成物を得るように構成された第１の対のオリゴヌクレオチド・プライマーの各々の有効量と、

（ｉｉ）ポリメラーゼ連鎖反応において、陽性対照テンプレートの選択された第２のセグメントを増幅し、その結果として増幅された第２の生成物を得るように構成された第２の対のオリゴヌクレオチド・プライマーの各々

の有効量と、

（ｉｉｉ）有効量の核酸結合蛍光染料と、

を含む反応混合物において、

前記選択されたテンプレートと前記陽性対照テンプレートをポリメラーゼ連鎖反応によって増幅するための条件に、前記選択されたテンプレートと前記陽性対照テンプレートを曝すステップと、

（ｂ）前記ポリメラーゼ連鎖反応の増幅サイクル中に温度の関数として放射される蛍光を連続的にモニターして前記選択されたテンプレートが増幅した場合前記増幅した第１の生成物の第１の融解ピークを、また前記陽性対照テンプレートが増幅した場合前記増幅した第２の生成物の第２の融解ピークを得るために、前記反応混合物を選択された波長の光で照射して核酸結合蛍光染料による蛍光を顕在化するステップとを含み、

前記第２の融解曲線の取得はポリメラーゼ連鎖反応が作用したことを表わし、前記第１の融解曲線の取得は前記選択された第１のセグメントが増幅可能であることを表わし、前記第１の融解曲線が欠如していることは前記選択された第１のセグメントが増幅不可能であることを示す

ことを特徴とする方法。

１１．　個人の第Ｖ因子ライデン変異を検出する方法であって、第Ｖ因子ライデン変異は野生型と比較して第Ｖ因子ライデン変異遺伝子座での単一塩基変異で構成され、

（ａ）前記個人からゲノムＤＮＡサンプルを採取するステップと、

（ｂ）対照として野生型ゲノムＤＮＡを提供するステップと、

（ｃ）前記ゲノムＤＮＡサンプルと前記野生型ゲノムＤＮＡの選択されたセグメントをポリメラーゼ連鎖反応によって増幅し、結果として第Ｖ因子ライデン変異遺伝子座のコピーを含む増幅生成物を得るように構成されたオリゴヌクレオチド・プライマーの対を提供するステップであって、前記選択されたセグメントは第Ｖ因子ライデン変異遺伝子座を含むステップと、

（ｄ）蛍光共鳴エネルギー転移対の共鳴エネルギー転移供与体又は共鳴エネルギー転移受容体で標識されたオリゴヌクレオチド・プローブを提供するステップであって、前記プローブは前記変異遺伝子座にまたがり前記野生型ゲノムＤＮＡの融解プロファイルから区別できる前記ゲノムＤＮＡサンプルに第Ｖ因子ライデン変異が存在する場合融解プロファイルを示すように、

前記プローブが前記増幅された生成物にハイブリダイゼーションするように構成されているステップと、

（ｅ）共鳴エネルギー転移供与体又は共鳴エネルギー転移受容体で標識された転移オリゴヌクレオチドを提供するステップであって、前記プローブと転移オリゴヌクレオチドの間で一方が共鳴エネルギー転移供与体で標識され他方が共鳴エネルギー転移受容体で標識されているとして、前記プローブと前記転移オリゴヌクレオチドの両方が前記増幅生成物にハイブリダイゼーションする時に共鳴エネルギー転移供与体と共鳴エネルギー転移受容体が共鳴エネルギー転移関係にあるように前記転移オリゴヌクレオチドは前記増幅生成物にハイブリダイゼーションするように構成されるステップと、

（ｆ）有効量のオリゴヌクレオチド・プローブと転移オリゴヌクレオチドの存在下でゲノムＤＮＡサンプルと野生型ゲノムＤＮＡの前記選択したセグメントをポリメラーゼ連鎖反応により増幅し、結果として増幅した選択セグメントを得るステップであって、少なくとも増幅した選択セグメントの一部分は、共鳴エネルギー転移関係にある蛍光共鳴エネルギー転移対がハイブリダイゼーションした前記プローブと前記転移オリゴヌクレオチドの両方を有するステップと、

（ｇ）前記ポリメラーゼ連鎖反応の増幅サイクルの間、温度の関数として蛍光を測定し、結果としてゲノムＤＮＡサンプルの前記増幅セグメントから解離する前記プローブの融解プロファイルと前記野生型ゲノムＤＮＡの増幅セグメントから解離する前記プローブの融解プロファイルとを取得するステップと、

（ｈ）前記ゲノムＤＮＡサンプルに対する前記融解プロファイルを前記野生型ゲノムＤＮＡに対する前記融解プロファイルと比較するステップであって、これらの差が前記ゲノムＤＮＡサンプルにおける第Ｖ因子ライデン変異の存在を示すステップと、

を含むことを特徴とする方法。

１２．　核酸ハイブリダイゼーションを分析するための方法であって、

（ａ）分析すべき核酸サンプルと核酸結合蛍光体とを含む混合物を提供するステップと、

（ｂ）温度を≧毎秒０．１℃の速度で変化させながら蛍光をモニターするステップと、

を含むことを特徴とする方法。

１３．　未知の量の核酸を含むサンプルの初期コピー数を定量する方法であって、

（ａ）ポリメラーゼ連鎖反応により既知の濃度の少なくとも一つの標準を、前記標準と核酸結合蛍光体とを含む混合物中で増幅するステップであって、ここで前記核酸結合蛍光体は一対のオリゴヌクレオチド・プローブを含み、その一方は蛍光共鳴エネルギー転移対の供与体で標識され、他方は受容体で標識されるステップと、

（ｂ）サイクル数の関数として蛍光を測定し、結果として一組のデータ点を得るステップと、

（ｃ）初期核酸濃度とサイクル数の関数として蛍光を記述する所定の式に前記データ点を当てはめるステップと、

（ｄ）前記サンプルと前記核酸結合蛍光体とを含む混合物中で未知の量の核酸を含む前記サンプルを増幅してその蛍光をモニターするステップと、

（ｅ）ステップ（ｃ）で求めた式から初期核酸濃度を決定するステップと、

を含むことを特徴とする方法。

１４．　生物学的サンプルの標的ＤＮＡ配列を分析するための方法であって、

核酸結合蛍光体の存在下にポリメラーゼ連鎖反応によって前記標的配列を増幅するステップであって、前記ポリメラーゼ連鎖反応は熱安定性ポリメラーゼ及び前記標的とする核酸配列に対するプライマーを前記生物学的サンプルに添加して少なくとも変性温度と伸張長温度の間で前記生物学的サンプルを熱サイクルするステップを含むステップと、

前記核酸結合蛍光体により吸収される波長の光によって前記サンプルを励起するステップと、

前記サンプルの温度が変化する時に前記核酸結合蛍光体からの温度依存性蛍光をモニターするステップと、

を含むことを特徴とする方法。

１５．　生物学的サンプルにおいて増幅中に標的とする核酸配列を検出する方法であって、

熱安定性ポリメラーゼ及び前記標的核酸配列の増幅用に設計されたプライマーを前記生物学的サンプルに添加するステップと、

ＳＹＢＲ™グリーンＩとピコグリーンからなるグループから選択される蛍

光染料の存在下にポリメラーゼ連鎖反応により前記標的核酸配列を増幅するステップであって、該ポリメラーゼ連鎖反応は、３０回の増幅サイクルが１０分から３０分で完了する迅速温度サイクルプロファイルを用いて、少なくとも変性温度と伸張温度の間で前記生物学的サンプルを複数回熱サイクルすることを含むステップと、

前記蛍光染料により吸収される波長の光によって前記増幅された標的核酸配列を含む前記生物学的サンプルを励起するステップと、

前記サンプル中の前記増幅された標的核酸配列の量に関連した、前記蛍光染料からの蛍光放射を検出するステップと、

を含む方法。

１６．　生物学的サンプルにおいて標的とする核酸配列の増幅をリアルタイムでモニターする方法であって、

所定量のＳＹＢＲ™グリーンＩ存在下にポリメラーゼ連鎖反応により前記標的配列を増幅するステップであって、前記ポリメラーゼ連鎖反応が、ＳＹＢＲ™グリーンＩ、熱安定性ポリメラーゼ、及び前記標的核酸配列に対するプライマーを前記生物学的サンプルに添加して増幅混合物を作製するステップと少なくとも変性温度と伸張温度の間で前記増幅混合物を複数回熱サイクルするステップとを含むステップと、

前記複数回の増幅サイクルの少なくとも一部において、ＳＹＢＲ™グリーンＩによって吸収される波長の光で前記混合物を照射するステップと、

サンプル照射に続いてＳＹＢＲ™グリーンＩからの蛍光放射を検出するステップであって、前記蛍光放射が前記サンプル中の増幅標的核酸の量に関連しているステップと、

を含む方法。

１７．　生物学的サンプルにおいて標的とする核酸配列の増幅をリアルタイムでモニターする方法であって、

ＳＹＢＲ™グリーンＩ存在下にポリメラーゼ連鎖反応により前記標的配列を増幅するステップであって、前記ポリメラーゼ連鎖反応が、ＳＹＢＲ™グリーンＩ、熱安定性ポリメラーゼ、及び前記標的核酸配列に対するプライマーを前記生物学的サンプルに添加して増幅混合物を作製するステップとＳＹＢＲ™グリーンＩが核酸配列の量に関連した蛍光シグナルを生成する能力を保持する条件下で少なくとも変性温度と伸張温度の間で前記増幅混合物

を複数回熱サイクルするステップとを含むステップと、

前記複数回の増幅サイクルの少なくとも一部にひきつづき、ＳＹＢＲ™グリーンＩによって吸収される波長の光で前記サンプルを照射するステップと、

増幅標的配列に対する融解曲線を得るためのサンプル温度の関数として、サンプル中のＳＹＢＲ™グリーンＩからの蛍光放射をモニターするステップと、

を含む方法。

１８．　生物学的サンプルにおいて、ポリメラーゼ連鎖反応中に、核酸配列の増幅をモニターする方法であって、

前記生物学的サンプルと、該サンプル中に存在する核酸の量に関連した蛍光シグナルを生成することができる蛍光体と、熱安定性ポリメラーゼと、核酸に対するプライマーとを含む増幅混合物を作製するステップと、

前記増幅混合物を複数回熱サイクルすることにより、標的配列を増幅させるステップと、

前記サンプルを照射し、増幅中に蛍光体からの蛍光シグナルをモニターするステップと、を含み、さらに、

ＳＹＢＲ™グリーンＩとピコグリーンからなるグループから前記蛍光体を選択するステップを含むことを特徴とする方法。

１９．　ＰＣＲ反応生成混合物であって、

増幅した核酸生成物と、前記混合物中で前記増幅核酸生成物の濃度の指標となる蛍光シグナルを与えることができる量のＳＹＢＲ™グリーンＩとを含み、

増幅させる標的核酸と、オリゴヌクレオチド・プライマーと、熱安定性ポリメラーゼと、ＳＹＢＲ™グリーンＩとを含むＰＣＲ増幅混合物を前記標的核酸が増幅するのに十分な回数の熱サイクルを行うことによって調製されることを特徴とするＰＣＲ反応生成混合物。

２０．　増幅中に核酸配列を分析するためのキットであって、

ＳＹＢＲ™グリーンＩとピコグリーンからなるグループから選択される蛍光染料と、熱安定性ＤＮＡポリメラーゼと、デオキシヌクレオチド３リン酸とを含む増幅溶液を含むキット。

２１．　生物学的サンプルにおいて増幅中に標的とする核酸配列を検出する方法であって、

熱安定性ポリメラーゼ及び前記標的核酸配列の増幅用に設計されたプライマーを前記生物学的サンプルに添加するステップと、

ＳＹＢＲ™グリーンＩとピコグリーンからなるグループから選択される蛍光染料の存在下にポリメラーゼ連鎖反応により前記標的核酸配列を増幅するステップであって、該ポリメラーゼ連鎖反応は、少なくとも変性温度と伸張温度の間で前記生物学的サンプルを複数回熱サイクルすることを含むステップと、

前記蛍光染料により吸収される波長の光によって前記増幅された標的核酸配列を含む前記生物学的サンプルを照射するステップと、

前記サンプル中の前記増幅された標的核酸配列の量に関連した、前記蛍光染料からの蛍光放射を検出するステップと、を含み

前記複数の増幅サイクルの各サイクル中で前記サンプルは伸張温度に６０秒より長く保持されることはなく、変性温度で１秒以上保持されることはないことを特徴とする方法。

【公報種別】特許法第１７条の２の規定による補正の掲載
【部門区分】第１部門第１区分
【発行日】平成19年6月7日(2007.6.7)

【公表番号】特表2000-509608(P2000-509608A)
【公表日】平成12年8月2日(2000.8.2)
【年通号数】公開・登録公報9999-99
【出願番号】特願平10-500916
【国際特許分類】
　Ｃ１２Ｑ　　1/68　　(2006.01)
　Ｃ１２Ｎ　　15/09　　(2006.01)
【ＦＩ】
　Ｃ１２Ｑ　　1/68　　Ａ
　Ｃ１２Ｎ　　15/00　　ＺＮＡＡ

【手続補正書】
【提出日】平成19年1月19日(2007.1.19)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】補正の内容のとおり
【補正方法】変更
【補正の内容】

手続補正書

平成１９年　１月１９日

特　許　庁　長　官　殿

１．事件の表示

平成１０年特許願第５００９１６号

２．発明の名称

ＰＣＲ中のハイブリダイゼーションのモニタリング

３．補正をする者

事件との関係　特許出願人

住　所　アメリカ合衆国・ユタ州　８４１１２・ソルト　レイク　シティ・パーク　ビルディング　２１０

名　称　ユニバーシティ　オブ　ユタ　リサーチ　ファウンデーション

４．代　理　人

住　所　〒105-0004 東京都港区新橋２丁目１２番７号
労金新橋ビル３階　電話３５０８－０３３６（代）

氏　名　(7128) 弁理士　一　色　健　輔

住　所　同　上

氏　名　(8490) 弁理士　原　島　典　孝

５．補正対象書類名

（１）明細書

６．補正対象項目名

（１）請求の範囲

７．補正の内容

（１）請求の範囲を別紙の通り補正する。

特許庁
19.1.19
出願支援課
窓口

方式審査　渡辺

請求の範囲

１．　生物学的サンプルの標的ＤＮＡ配列を分析するための方法であって、

標的配列の隣接部分にハイブリダイゼーションする２つの核酸プローブ存在下において、前記標的配列をポリメラーゼ連鎖反応により増幅する工程と、

ドナーフルオロフォアによって吸収される波長の光で前記生物学的サンプルを励起し、蛍光エネルギー転移対からの発光を検出する工程と、

を含み、

前記プローブの一方は蛍光エネルギー転移対のアクセプターフルオロフォアで標識され、前記プローブの他方は蛍光エネルギー転移対のドナーフルオロフォアで標識されており、

前記標的配列に前記２つのプローブがハイブリダイゼーションした場合、前記ドナーフルオロフォアとアクセプターフルオロフォアとが互いに２５ヌクレオチド以内にあり、

前記ポリメラーゼ連鎖反応は、熱安定性ポリメラーゼと前記標的核酸配列に対するプライマーとを前記生物学的サンプルに添加する工程と、少なくとも変性温度と伸張温度との間で前記生物学的サンプルを熱サイクルする工程とを含むこと、

を特徴とする方法。

２．　生物学的サンプルの標的核酸配列を増幅するための改良方法であって、

（ａ）前記生物学的サンプルに有効量の核酸結合蛍光体を添加する工程と、

（ｂ）所定の初期の温度パラメータと時間パラメータとを用いるポリメラーゼ連鎖反応によって前記標的核酸配列を増幅する工程と、

を含み、

前記標的核酸を増幅する工程は、

（ｉ）前記ポリメラーゼ連鎖反応中に、前記蛍光体によって吸収される選択された波長の光で前記生物学的サンプルを照射する工程と、

（ｉｉ）前記ポリメラーゼ連鎖反応において、最適な温度パラメータと時間パラメータとを決定するために、前記サンプルからの蛍光をモニターする工程と、

（ｉｉｉ）前記検出された蛍光に基づいて、前記ポリメラーゼ連鎖反応中に開始温度パラメータと時間パラメータとを調整する工程と、

を含み、

前記ポリメラーゼ連鎖反応は、熱安定性ポリメラーゼと前記標的核酸配列に対するプライマーとを前記生物学的サンプルに添加する工程と、少なくとも変性温度と伸張温度との間で前記生物学的サンプルを熱サイクルする工程とを含むこと、

を特徴とする方法。

３．　生物学的サンプルにおける標的核酸配列のポリメラーゼ連鎖反応増幅をリアルタイムでモニターする方法であって、

ＳＹＢＲ™グリーンＩ存在下において、ポリメラーゼ連鎖反応により前記標的配列を増幅する工程と、

前記ＳＹＢＲ™グリーンＩにより吸収される波長の光で、前記生物学的サンプルを励起して前記生物学的サンプルからの発光を検出する工程と、

前記ＳＹＢＲ™グリーンＩからの温度依存性蛍光をモニターする工程と、

を含み、

前記ポリメラーゼ連鎖反応は、熱安定性ポリメラーゼと前記標的核酸配列に対するプライマーとを前記生物学的サンプルに添加する工程と、少なくとも変性温度と伸張温度との間で前記生物学的サンプルを熱サイクルする工程とを含むこと、

を特徴とする方法。

４．　生物学的サンプルの標的ＤＮＡ配列を分析するための方法であって、

（ａ）有効量の核酸プローブと２つの核酸プライマーとを前記生物学的サンプルに添加する工程と、

（ｂ）ポリメラーゼ連鎖反応により前記標的核酸配列を増幅する工程と、

（ｃ）前記ドナーフルオロフォアによって吸収される選択した波長の光で前記生物学的サンプルを照射し、前記サンプルの蛍光発光を検出する工程と、

を含み、

前記プライマーの一方と前記プローブは、アクセプターフルオロフォアとド

ナーフルオロフォアとを含む一つの蛍光エネルギー転移対で各々標識され、

前記標識されたプローブは、前記標識されたプライマーの１５ヌクレオチド以内において、前記標的核酸配列の増幅コピーとハイブリダイゼーションすること、

を特徴とする方法。

５． 選択されたポリメラーゼ連鎖反応混合物における増幅生成物の濃度を決定する方法であって、

（ａ）既知の濃度の前記増幅生成物のハイブリダイゼーションの速度をモニターすることにより、選択された温度と反応条件とにおいて前記増幅生成物に対する２次速度定数を決定する工程と、

（ｂ）未知の濃度の前記増幅生成物に対するアニーリング速度を決定する工程と、

（ｃ）前記アニーリング速度と前記２次速度定数から前記増幅生成物の濃度を計算する工程と、

を含むことを特徴とする方法。

６． 増幅生成物の濃度を求めるために、前記増幅生成物に対する２次速度定数を決定する方法であって、

変性増幅生成物を得るために、既知の濃度の前記増幅生成物と有効量の二重鎖特異性蛍光染料とを含む第１のポリメラーゼ連鎖反応混合物の温度を、前記増幅生成物の変性温度以上に上昇させる工程と、

前記既知の量の変性増幅生成物を含む前記第１のポリメラーゼ連鎖反応混合物の温度を、前記増幅生成物の変性温度以下の選択された温度まで急速に下げながら、時間の関数として前記第１のポリメラーゼ連鎖反応混合物の蛍光を連続的にモニターする工程と、

前記既知の濃度の増幅生成物に対する極大蛍光、極小蛍光、極小蛍光での時間、及び２次速度定数を、下式

$$F = F_{max} - \frac{F_{max} - F_{min}}{k(t - t_0)[DNA] + 1}$$

（式中、Ｆは蛍光、F_{max}は極大蛍光、F_{min}は極小蛍光、ｋは２次速度定数、t_0はF_{min}での時間、［ＤＮＡ］は前記増幅生成物の既知の濃度、である。）
から決定するために、時間の関数として蛍光をプロットする工程と、
を含むことを特徴とする方法。

７．　競合的定量ポリメラーゼ連鎖反応によって選択された核酸テンプレートの濃度を決定する方法であって、

（ａ）

（ｉ）ポリメラーゼ連鎖反応による増幅生成物を得るために、ポリメラーゼ連鎖反応において、前記選択されたテンプレートの選択されたセグメントと競合的テンプレートの前記セグメントに対応する選択されたセグメントとを増幅するように設計された、有効量の各オリゴヌクレオチド・プライマー対と、

（ii）蛍光共鳴エネルギー転移対の共鳴エネルギー転移ドナー又は蛍光共鳴エネルギー転移対の共鳴エネルギー転移アクセプターで標識された有効量のオリゴヌクレオチド・プローブと、

（iii）前記プローブと転移オリゴヌクレオチドとの間で、一方が前記ドナーにより標識され、他方が前記アクセプターにより標識されている場合、前記ドナー又は前記アクセプターで標識された有効量の基準オリゴヌクレオチドと、
を含み、

前記プローブは、前記競合的テンプレートの増幅生成物から解離する解離温度から識別可能な解離温度において、前記選択したテンプレートの増幅生成物から解離するように、前記増幅生成物にハイブリダイゼーションするように構成され、

前記基準オリゴヌクレオチドは、前記プローブと前記基準オリゴヌクレオチドの両方が前記増幅生成物にハイブリダイゼーションする時、前記ドナーと前記アクセプターが共鳴エネルギー転移関係になるように、前記増幅生成物にハイ

ブリダイゼーションするよう構成されていること、
を特徴とする反応混合物において、

ポリメラーゼ連鎖反応による前記増幅生成物を得るために、ポリメラーゼ連鎖反応により、未知の量の選択されたテンプレートと既知の量の前記競合的テンプレートとを増幅する工程と、

（ｂ）前記選択されたテンプレートの前記増幅生成物から解離する前記プローブの第１の解離曲線と、前記競合的テンプレートから解離する前記プローブの第２の解離曲線とを得るために、蛍光共鳴エネルギー転移対によって蛍光を照射させるために前記反応混合物を選択された波長の光で照射し、反応混合物の温度が変化した時に温度の関数として蛍光発光を決定する工程と、

（ｃ）前記第１の解離曲線と前記第２の解離曲線とを第１の解離ピークと第２の解離ピークとに変換し、前記解離ピークから前記選択されたテンプレートと前記競合的テンプレートとの相対量を決定する工程と、

（ｄ）前記既知の量の前記競合的テンプレート、及び相対量の前記選択されたテンプレートと競合的テンプレートに基づいて、前記選択されたテンプレートの濃度を計算する工程と、
を含むことを特徴とする方法。

８．　ポリメラーゼ連鎖反応において選択された核酸テンプレートの濃度を決定する方法であって、

（ａ）

（ｉ）ポリメラーゼ連鎖反応による第１の増幅生成物を得るために、ポリメラーゼ連鎖反応において、前記選択されたテンプレートの選択された第１のセグメントを増幅するように設計された、有効量の各第１のオリゴヌクレオチド・プライマー対と、

（ii）ポリメラーゼ連鎖反応による第２の増幅生成物を得るために、ポリメラーゼ連鎖反応において、基準テンプレートの選択された第２のセグメントを増幅するように設計された、有効量の各第２のオリゴヌクレオチド・プライマー対と、

（iii）有効量の核酸結合蛍光染料と、

を含む反応混合物において、

ポリメラーゼ連鎖反応による前記第１の増幅生成物を得るために未知の量の前記選択されたテンプレートと、ポリメラーゼ連鎖反応による前記第２の増幅生成物を得るために既知の量の前記基準テンプレートとを、ポリメラーゼ連鎖反応によって増幅する工程と、

（ｂ）第１の生成物と第２の生成物とが異なる温度で解離するような前記増幅生成物の解離曲線を得るために、核酸結合蛍光染料によって蛍光を照射させるために前記反応混合物を選択された波長の光で照射し、発光した蛍光を温度の関数として連続的にモニターする工程と、

（ｃ）前記解離曲線を解離ピークに変換し、前記解離ピークから前記選択されたテンプレートと前記基準テンプレートとの相対量を決定する工程と、

（ｄ）前記既知の量の前記基準テンプレート、及び相対量の前記選択されたテンプレートと基準テンプレートに基づいて、前記選択されたテンプレートの濃度を計算する工程と、

を含むことを特徴とする方法。

９．　陽性対照テンプレートも含むポリメラーゼ連鎖反応において、選択されたテンプレートの増幅をモニターする方法であって、

（ａ）

（ｉ）ポリメラーゼ連鎖反応による第１の増幅生成物を得るために、ポリメラーゼ連鎖反応において、前記選択されたテンプレートの選択された第１のセグメントを増幅するように設計された、有効量の各第１のオリゴヌクレオチド・プライマー対と、

（ii）ポリメラーゼ連鎖反応による第２の増幅生成物を得るために、ポリメラーゼ連鎖反応において、陽性対照テンプレートの選択された第２のセグメントを増幅するように設計された、有効量の各第２のオリゴヌクレオチド・プライマー対と、

（iii）有効量の核酸結合蛍光染料と、

を含む反応混合物において、

前記選択されたテンプレートと前記陽性対照テンプレートとをポリメラーゼ連

鎖反応によって増幅するための条件に、前記選択されたテンプレートと前記陽性対照テンプレートとを置く工程と、

（ｂ）前記選択されたテンプレートが増幅した場合における前記増幅した第１の生成物の第１の解離ピークと、前記陽性対照テンプレートが増幅した場合における前記増幅した第２の生成物の第２の解離ピークとを得るために、核酸結合蛍光染料によって蛍光を照射させるために前記反応混合物を選択された波長の光で照射し、前記ポリメラーゼ連鎖反応の増幅サイクル中に発光する蛍光を温度の関数として連続的にモニターする工程と、

を含み、

前記第２の解離曲線の取得は、ポリメラーゼ連鎖反応が作用したことを示し、

前記第１の解離曲線の取得は、前記選択された第１のセグメントが増幅可能であることを示し、

前記第１の解離曲線の欠如は、前記選択された第１のセグメントが増幅不可能であることを示すこと、

を特徴とする方法。

１０．　個人の第Ｖ因子ライデン変異を検出する方法であって、

（ａ）前記個人からゲノムＤＮＡサンプルを採得する工程と、

（ｂ）対照として野生型ゲノムＤＮＡを提供する工程と、

（ｃ）第Ｖ因子ライデン変異遺伝子座のコピーを含む増幅生成物を得るために、前記ゲノムＤＮＡサンプルと前記野生型ゲノムＤＮＡの選択されたセグメントをポリメラーゼ連鎖反応によって増幅するように設計された、オリゴヌクレオチド・プライマーの対を提供する工程と、

（ｄ）蛍光共鳴エネルギー転移対の共鳴エネルギー転移ドナー又は蛍光共鳴エネルギー転移対の共鳴エネルギー転移アクセプターで標識されたオリゴヌクレオチド・プローブを提供する工程と、

（ｅ）前記プローブと転移オリゴヌクレオチドとの間で、一方が前記共鳴エネルギー転移ドナーにより標識され、他方が前記共鳴エネルギー転移アクセプターにより標識されている場合、前記共鳴エネルギー転移ドナー又は前記共鳴エネルギー転移アクセプターで標識された転移オリゴヌクレオチドを提供する工程と、

（ｆ）増幅した選択セグメントを得るために、有効量のオリゴヌクレオチド・プローブと転移オリゴヌクレオチドの存在下において、ポリメラーゼ連鎖反応によって、ゲノムＤＮＡサンプルと野生型ゲノムＤＮＡの前記選択したセグメントを増幅する工程と、

（ｇ）ゲノムＤＮＡサンプルの前記増幅セグメントから解離する前記プローブの解離プロファイルと、前記野生型ゲノムＤＮＡの増幅セグメントから解離する前記プローブの解離プロファイルとを得るために、前記ポリメラーゼ連鎖反応の増幅サイクルの間、温度の関数として蛍光を測定する工程と、

（ｈ）前記ゲノムＤＮＡサンプルに対する前記解離プロファイルを、前記野生型ゲノムＤＮＡに対する前記解離プロファイルと比較する工程と、

を含み、

前記第Ｖ因子ライデン変異は、野生型と比較して第Ｖ因子ライデン変異遺伝子座の単一塩基変異からなり、

前記選択されたセグメントは、前記第Ｖ因子ライデン変異遺伝子座を含み、

前記プローブは、前記変異遺伝子座に広がるように、また、前記野生型ゲノムＤＮＡの解離プロファイルから区別できる前記ゲノムＤＮＡサンプルにおいて第Ｖ因子ライデン変異が存在する場合に、解離プロファイルを示すように前記増幅生成物にハイブリダイゼーションするように構成され、

前記転移オリゴヌクレオチドは、前記プローブと前記転移オリゴヌクレオチドの両方が前記増幅生成物にハイブリダイゼーションする時に、前記共鳴エネルギー転移ドナーと前記共鳴エネルギー転移アクセプターが共鳴エネルギー転移関係にあるように、前記増幅生成物にハイブリダイゼーションするように構成され、

少なくとも増幅した前記選択セグメントの一部分は、共鳴エネルギー転移関係にある蛍光共鳴エネルギー転移対でハイブリダイゼーションした前記プローブと前記転移オリゴヌクレオチドの両方を有し、

前記解離プロファイル同士の違いは、前記ゲノムＤＮＡサンプルにおける第Ｖ因子ライデン変異の存在を示すこと、

を特徴とする方法。

１１．　核酸ハイブリダイゼーションを分析するための方法であって、

（ａ）分析すべき核酸サンプルと核酸結合蛍光体とを含む混合物を提供する工程と、

（ｂ）温度を≧０．１℃／毎秒の速度で変化させながら蛍光をモニターする工程と、

を含むことを特徴とする方法。

１２．　未知の量の核酸を含むサンプルの初期コピー数を定量する方法であって、

（ａ）ポリメラーゼ連鎖反応により、既知の濃度の少なくとも一つの標準を、前記標準と核酸結合蛍光体とを含む混合物中で増幅する工程と、

（ｂ）一組のデータ点を得るために、サイクル数の関数として蛍光を測定する工程と、

（ｃ）初期核酸濃度とサイクル数の関数として、蛍光を記述する所定の式に前記データ点を当てはめる工程と、

（ｄ）前記サンプルと前記核酸結合蛍光体とを含む混合物中で、未知の量の核酸を含む前記サンプルを増幅する工程、及びその蛍光をモニターする工程と、

（ｅ）工程（ｃ）で求めた式から初期核酸濃度を決定する工程と、

を含み、

前記核酸結合蛍光体は一対のオリゴヌクレオチド・プローブを含み、その一方は蛍光共鳴エネルギー転移対のドナーで標識され、他方は蛍光共鳴エネルギー転移対のアクセプターで標識されていること、

を特徴とする方法。

１３．　生物学的サンプルの標的ＤＮＡ配列を分析するための方法であって、

核酸結合蛍光体の存在下において、ポリメラーゼ連鎖反応によって前記標的配列を増幅する工程と、

前記核酸結合蛍光体により吸収される波長の光によって前記サンプルを励起する工程と、

前記サンプルの温度が変化する時に、前記核酸結合蛍光体からの温度依存性蛍光をモニターする工程と、

を含み、

前記ポリメラーゼ連鎖反応は、熱安定性ポリメラーゼと前記標的とする核酸

配列に対するプライマーとを前記生物学的サンプルに添加する工程と、少なくとも変性温度と伸張長温度との間で前記生物学的サンプルを熱サイクルする工程とを含むこと、
を特徴とする方法。

１４． 生物学的サンプルにおいて増幅中に標的とする核酸配列を検出する方法であって、

熱安定性ポリメラーゼと、前記標的核酸配列の増幅用に設計されたプライマーを前記生物学的サンプルに添加する工程と、

ＳＹＢＲ™グリーンＩとピコグリーンからなるグループから選択される蛍光染料の存在下において、ポリメラーゼ連鎖反応により前記標的核酸配列を増幅する工程と、

前記蛍光染料により吸収される波長の光によって前記増幅された標的核酸配列を含む前記生物学的サンプルを励起する工程と、

前記サンプル中の前記増幅された標的核酸配列の量に関連した、前記蛍光染料からの蛍光発光を検出する工程と、
を含み、

前記ポリメラーゼ連鎖反応は、３０回の増幅サイクルが１０分から３０分で完了する迅速温度サイクルプロファイルを用いて、少なくとも変性温度と伸張温度との間で前記生物学的サンプルを複数回熱サイクルする工程を含むこと、
を特徴とする方法。

１５． 生物学的サンプルにおいて標的とする核酸配列の増幅をリアルタイムでモニターする方法であって、

所定量のＳＹＢＲ™グリーンＩ存在下において、ポリメラーゼ連鎖反応により前記標的配列を増幅する工程と、

複数回の増幅サイクルの少なくとも一部において、ＳＹＢＲ™グリーンＩによって吸収される波長の光で増幅混合物を照射する工程と、

サンプル照射に続いてＳＹＢＲ™グリーンＩからの蛍光発光を検出する工程と、
を含み、

前記ポリメラーゼ連鎖反応は、増幅混合物を作製するために、ＳＹＢＲ™グリーンＩと、熱安定性ポリメラーゼと、前記標的核酸配列に対するプライマーとを前記生物学的サンプルに添加する工程と、少なくとも変性温度と伸張温度との間で前記増幅混合物を複数回熱サイクルする工程とを含み、

前記蛍光発光は、前記サンプル中の増幅標的核酸の量に関連していること、を特徴とする方法。

１６．　生物学的サンプルにおいて標的とする核酸配列の増幅をリアルタイムでモニターする方法であって、

ＳＹＢＲ™グリーンＩ存在下において、ポリメラーゼ連鎖反応により前記標的配列を増幅する工程と、

前記複数回の増幅サイクルの少なくとも一部にひきつづき、ＳＹＢＲ™グリーンＩによって吸収される波長の光で前記サンプルを照射する工程と、

増幅標的配列に対する解離曲線を得るためのサンプル温度の関数として、サンプル中のＳＹＢＲ™グリーンＩからの蛍光発光をモニターする工程と、

を含み、

前記ポリメラーゼ連鎖反応は、増幅混合物を作製するために、ＳＹＢＲ™グリーンＩと、熱安定性ポリメラーゼと、前記標的核酸配列に対するプライマーとを前記生物学的サンプルに添加する工程と、ＳＹＢＲ™グリーンＩが核酸配列の量に関連した蛍光シグナルを生成する能力を保持する条件下で、少なくとも変性温度と伸張温度との間で前記増幅混合物を複数回熱サイクルする工程とを含むこと、

を特徴とする方法。

１７．　生物学的サンプルにおいて、ポリメラーゼ連鎖反応中に、核酸配列の増幅をモニターする方法であって、

前記生物学的サンプルと、前記サンプル中に存在する核酸の量に関連した蛍光シグナルを生成することができる蛍光体と、熱安定性ポリメラーゼと、核酸に対するプライマーとを含む増幅混合物を作製する工程と、

前記増幅混合物を複数回熱サイクルすることにより、標的配列を増幅させる工程と、

前記サンプルを照射し、増幅中に蛍光体からの蛍光シグナルをモニターする工程と、

を含み、さらに、

ＳＹＢＲ™グリーンＩとピコグリーンとからなるグループから前記蛍光体を選択する工程と、

を含むことを特徴とする方法。

１８．　ＰＣＲ反応生成混合物であって、

増幅した核酸生成物と、

前記混合物中で前記増幅核酸生成物の濃度の指標となる蛍光シグナルを与えることができる量のＳＹＢＲ™グリーンＩと、

を含み、

前記反応生成混合物は、増幅させる標的核酸と、オリゴヌクレオチド・プライマーと、熱安定性ポリメラーゼと、ＳＹＢＲ™グリーンＩとを含むＰＣＲ増幅混合物とを、前記標的核酸が増幅するのに十分な回数の熱サイクルを行うことによって調製されること、

を特徴とするＰＣＲ反応生成混合物。

１９．　増幅中に核酸配列を分析するためのキットであって、

ＳＹＢＲ™グリーンＩとピコグリーンとからなるグループから選択される蛍光染料と、熱安定性ＤＮＡポリメラーゼと、デオキシヌクレオチド３リン酸とを含有する増幅溶液を含むことを特徴とするキット。

２０．　生物学的サンプルにおいて増幅中に標的とする核酸配列を検出する方法であって、

熱安定性ポリメラーゼと、前記標的核酸配列の増幅用に設計されたプライマーとを前記生物学的サンプルに添加する工程と、

ＳＹＢＲ™グリーンＩとピコグリーンからなるグループから選択される蛍光染料の存在下において、ポリメラーゼ連鎖反応により前記標的核酸配列を増幅する工程と、

前記蛍光染料により吸収される波長の光によって前記増幅された標的核酸配列を含む前記生物学的サンプルを照射する工程と、

前記サンプル中の前記増幅された標的核酸配列の量に関連した、前記蛍光染料からの蛍光発光を検出する工程と、
を含み、

前記ポリメラーゼ連鎖反応は、少なくとも変性温度と伸張温度との間で前記生物学的サンプルを複数回熱サイクルする工程を含み、

前記複数の増幅サイクルの各サイクル中で、前記サンプルは伸張温度に６０秒より長く保持されることはなく、変性温度で１秒以上保持されることはないこと、
を特徴とする方法。